

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U, N° 25

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE
L'ACTION DU SULFATE DE QUININE
SUR *amœba dubia*

THÈSE
pour l'obtention du Diplôme de
Docteur de l'Université de Paris
présentée et soutenue le 1939

PAR
René ROLLÉ
Pharmacien
Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. L. LAUNOY, *Président.*
R. FABRE, *Professeur.*
J. RÉGNIER, *Maître de Conférences.*

PARIS
IMPRIMERIE FROITIER
RUE SAINT-MAUR

1939



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555821_0077

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE
L'ACTION
DU
SULFATE DE QUININE
SUR *amœba dubia*

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Série U, N° 25

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE
L'ACTION DU SULFATE DE QUININE

SUR *amæba dubia*

THÈSE

pour l'obtention du Diplôme de

Docteur de l'Université de Paris

présentée et soutenue le

1939

PAR

René ROLLÉ

Pharmacien
Interne des Hôpitaux de Paris

JURY { MM. L. LAUNOY, *Président.*
R. FABRE, *Professeur.*
J. RÉGNIER, *Maître de Conférences.*

PARIS
IMPRIMERIE FROITIER
RUE SAINT-MAUR

1939

Personnel de la Faculté de Pharmacie de Paris

ADMINISTRATION

MM. DAMIENS, *Doyen*, O. *, ☼ I.
P. LEBEAU, *Assesseur*, O. *, ☼ I. Membre de l'Institut.
H. J. LIONNET, *Secrétaire*, ☼ I.

PROFESSEURS

MM. LEBEAU, O. *, ☼ I., Membre de l'Institut . Pharmacie chimique.
GORIS, O. *, ☼ I. Pharmacie galénique.
DAMIENS, *, ☼ I. Chimie minérale.
HERISSEY, O. *, ☼ I. Chimie biologique.
SOMMELET, *, ☼ I. Chimie organique.
LUTZ, *, ☼ I. Cryptogamie et Microbiologie.
FABRE, *, ☼ I. Toxicologie.
LAUNOY, O. *, ☼ I. Zoologie.
DELABY, *, ☼ I. Chimie analytique.
PICON, *, ☼ I. Physique.
MASCRÉ, ☼ I. Histoire naturelle des médicaments simples d'origine végétale.
BACH, ☼ I. Botanique générale.

Doyens honoraires : MM. RADAIS, O. *, ☼ I. — GUERIN, O. *, ☼ I.

Professeurs honoraires :

MM. BEHAL, G. O. *, ☼ I., et DELÉPINE, O. *, ☼ I., Membres de l'Institut,
PERROT, C. *, ☼ I., COUTIERE, O. *, ☼ I., BOUGAULT, O. *, ☼ I.,
et TASSILLY, O. *, ☼ I.

MAITRES DE CONFERENCES

FLEURY, ☼ I. Hydrologie et Hygiène.
BEDEL, ☼ I. Minéralogie, Législation et
Déontologie pharmaceuti-
ques.
RÉGNIER, ☼ I. Parasitologie.
CHARONNAT, ☼ I. Chimie et Pharmacie Chi-
mique.
JANOT Pharmacie galénique et bio-
logie végétale.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DOMANGE, travaux pratiques de 1^{re} année. Chimie générale et pharma-
ceutique.
GAUTIER, ☼ A. trav. prat. de 2^e et 3^e année. Chimie analytique.
PARIS Micrographie.
CORRIEZ Physique.
VALETTE, ☼ A. Microbiologie.
GUILLOT, travaux pratiques de 4^e année. Chimie biologique, Bromato-
logie et Pharmacie chi-
mique.

Bibliothécaire en chef : M. GARNIER, ☼ A.



A MA MERE

*Je dédie cette thèse en témoignage de
toute ma gratitude et de mon affec-
tueuse tendresse.*

A LA MEMOIRE DE MES GRANDS-PARENTS

A MON PERE

A MES FRERES ET SŒURS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

En témoignage de ma profonde affection.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. LAUNOY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Officier de la Légion d'Honneur

Hommage de respectueuse gratitude.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR R. FABRE

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Pharmacien des Hôpitaux.
Chevalier de la Légion d'Honneur.

A MONSIEUR J. REGNIER

Maître de Conférences à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Pharmacien des Hôpitaux.

Hommage de respectueux dévouement.

A MONSIEUR GUILLAUME VALETTE

Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Paris.
Pharmacien des Hôpitaux

*En témoignage de ma gratitude pour
l'aide précieuse qu'il m'a apportée dans
l'accomplissement de ce travail.*

PLAN

INTRODUCTION

CHAPITRE PREMIER

Généralités concernant l'Action de la Quinine sur les Protozoaires

- § I. — Action de la Quinine sur les cellules et les tissus
 - § II. — Influence de différents facteurs sur l'action physiologique de la Quinine
 - § III. — Fixation de la Quinine sur les cellules
-

CHAPITRE II

Culture et isolement des Amibes

- § I. — Milieux de culture
 - § II. — Différentes espèces d'amibes étudiées et caractérisation de *Amœbia dubia*
-

CHAPITRE III

Fluorescence de la Quinine

- § I. — Etude macroscopique du phénomène
 - 1° Généralités
 - 2° Influence du pH
 - 3° Influence des sulfates alcalins
 - 4° Action de l'ion chlore
 - 5° Action des hématies
 - 6° Action du sérum sanguin
- § II. — Microscopie de fluorescence

CHAPITRE IV

Résultats Généraux concernant l'action du Sulfate de Quinine sur les Amibes

- § I. — Détermination de la mort d'une amibe. Intoxication
 - § II. — Etude de la pénétration du Sulfate de Quinine par l'observation en lumière ultra-violette
 - § III. — Influence du pH sur la toxicité et la pénétration de la Quinine
 - § IV. — Pénétration du rouge neutre chez les amibes et influence du colorant sur la toxicité et la pénétration du Sulfate de Quinine
 - § V. — Elimination du Sulfate de Quinine
-

CHAPITRE V

L'action du Sulfate de Quinine sur les Amibes en présence des différentes substances

- § I. — Influence des saponines
- § II. — Influence des savons
- § III. — Influence des sels biliaires
- § IV. — Influence de la lécithine
- § V. — Influence du sérum sanguin

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

INTRODUCTION

Parmi les problèmes qui doivent retenir l'attention du pharmacologue, l'un des plus importants est celui qui a trait à la cause fondamentale de l'action des médicaments.

Ce problème qui résume en somme toute la pharmacodynamie, peut s'énoncer ainsi : comment se comporte une cellule vivante lorsqu'elle est soumise à l'action d'une substance chimique ?

L'étude approfondie d'un tel problème suppose parfaitement connus la constitution et le fonctionnement normal d'une cellule. Malheureusement, il faut avouer que les certitudes acquises dans ces domaines sont encore bien peu de chose en comparaison de ce qui reste à découvrir.

Toutefois, l'une des phases de l'action fondamentale d'un médicament sur la matière vivante peut être étudiée en particulier malgré l'insuffisance de nos méthodes d'investigation : c'est celle qui a trait aux modalités de la fixation de la substance chimique sur la cellule réceptrice. Ce problème a été étudié dans certains cas d'une manière directe, en observant les modifications d'aspect ou de composition de la cellule, ou d'une manière indirecte, en suivant les variations de concentration du milieu ambiant.

En ce qui concerne les alcaloïdes en particulier, la pénétration dans les cellules a pu directement être mise en évidence, au moins dans le cas des cellules végétales, grâce à l'apparition de précipités insolubles formés par le tanin qui y est contenu.

C'est là, toutefois, un fait qui ne saurait être généralisé à toutes les catégories de cellules.

Les avantages nombreux que présentent les colorants vitaux pour l'étude de la perméabilité cellulaire, étant donné la facilité avec laquelle on peut observer leur fixation en certaines régions du protoplasme, nous a conduit à étudier l'action des alcaloïdes décelables directement grâce à la fluorescence qu'ils présentent en solution aqueuse.

A ce point de vue, la quinine a paru offrir le maximum d'avantages. La fluorescence des solutions de sels de quinine est, en effet particulièrement intense. D'autre part, cet alcaloïde exerce une action toxique sur toutes les catégories de protoplasmes et sur les protozoaires en particulier.

En ce qui concerne les cellules à utiliser, nous nous sommes adressés aux protozoaires, facilement observables à l'état vivant, aussi peu différenciés que possible et de taille assez grande pour permettre leur examen microscopique approfondi. Notre choix s'est porté sur la variété *dubia* d'*Amœba proteus*.

Dans ces conditions, nous nous sommes proposés de résoudre les deux questions suivantes :

1° De quelle manière l'alcaloïde se fixe-t-il sur la cellule réceptrice ; y-a-t-il une localisation superficielle ou une véritable pénétration dans le protoplasme ?

2° Quelles sont les modifications structurales ou fonctionnelles présentées par la cellule à la suite de la fixation de l'alcaloïde ?

La première question a été abordée récemment par G. Vallette, qui, au moyen de la technique qui nous a permis de réaliser la plupart de nos expériences, a montré que chez *Paramœcium caudatum*, la quinine pénètre dans la cellule et comme les colorants vitaux basiques, se fixe exclusivement sur le vacuome.

Quant à la deuxième question, elle n'a été étudiée que par un petit nombre d'auteurs en ce qui concerne l'action toxique de la quinine.

L'exposé de nos recherches a été conçu de la façon suivante :

— Le premier chapitre sera réservé aux notions générales acquises jusqu'à maintenant concernant l'action qu'exerce la quinine sur les cellules et les protozoaires en particulier.

— Dans le deuxième chapitre, nous décrirons les différentes méthodes qui ont été préconisées pour la culture des amibes communes et de *Amœba proteus* et *dubia*, en particulier, et nous insisterons plus particulièrement sur la composition des milieux qui nous ont donné de bons rendements. Nous décrirons enfin les caractères particuliers de l'amibe que nous avons employée.

— Nous étudierons dans le troisième chapitre la fluorescence du sulfate de quinine en solution sulfurique, ses variations sous l'influence de certains facteurs : concentration, pH, ainsi que l'action qu'exercent sur son intensité des sub-

stances chimiques comme l'ion chlore, et les cellules animales comme les hématies.

La description de la méthode que nous avons utilisée pour l'observation microscopique de fluorescence, terminera ce chapitre.

— Nous consacrerons le quatrième chapitre à l'étude de l'action toxique de la quinine et à sa pénétration dans l'amibe, en considérant tout spécialement l'influence de la concentration et du pH des solutions alcaloïdiques. Nous nous occuperons également dans ce chapitre du processus d'élimination de la quinine chez l'amibe.

— Enfin, dans le cinquième chapitre, nous envisagerons l'action qu'exercent certaines substances, telles que la saponine, les savons, la lécithine, les sels biliaires, le sérum sanguin, sur la toxicité de la quinine et l'influence qu'exercent ces substances sur la vitesse de pénétration du toxique dans le protoplasme.

Au cours de la réalisation de ce travail, nous avons trouvé en Monsieur G. VALETTE, Pharmacien Chef de l'Hôpital Beaujon, un maître patient et dévoué qui n'a jamais cessé de nous prodiguer ses conseils compétents et judicieux. Nous sommes heureux de pouvoir le remercier ici de la grande sollicitude dont il a toujours fait preuve à notre égard.

Nous prions Monsieur le Professeur LAUNOY, qui nous a fait l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse, d'agréer l'hommage de notre reconnaissance pour les conseils et les encouragements que nous avons reçus de lui.

Nous exprimons également notre respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur FABRE et à Monsieur REGNIER, Maître de Conférences, qui ont bien voulu faire partie du Jury de cette thèse.

CHAPITRE PREMIER

Généralités concernant l'Action de la Quinine sur les Protozoaires

La quinine est, peut-être, de tous les alcaloïdes, celui qui a été le plus étudié du double point de vue chimique et pharmacodynamique.

Depuis sa découverte par Pelletier et Caventou en 1820, l'emploi de ce médicament s'est peu à peu généralisé dans la lutte contre le paludisme.

Cet alcaloïde exerce, en effet, une action toxique sur l'hématozoaire de Laveran, comme sur tous les protoplasmes vivants en général, et, particulièrement, sur les organismes inférieurs (Rhizopodes, Flagellés, Infusoires).

En concentration suffisante, elle paralyse toutes les formes de la matière vivante. Cette action toxique générale de la quinine a fait l'objet d'un assez grand nombre de recherches. Nous exposerons brièvement les résultats des plus importants de ces travaux :

§ 1. — ACTION DE LA QUININE SUR LES CELLULES ET LES TISSUS

1° Action sur les Protozoaires :

Chez les Rhizopodes, l'action de la quinine se manifeste par une abolition des mouvements amiboïdes et de la formation des pseudopodes. Au bout d'un certain temps, l'activité protoplasmique cesse complètement et la cellule se désagrége.

Chez les Infusoires (Paramécies) on observe également un

ralentissement de la vitesse de progression ; les mouvements des cils vibratiles s'atténuent peu à peu puis s'arrêtent ; enfin, survient la désagrégation cellulaire.

On doit faire remarquer toutefois que certains organismes présentent une résistance particulière à l'action de l'alcaloïde ; « c'est ainsi que les amibes d'eau salée et les spirochètes de la fièvre récurrente parviennent à vivre dans les solutions de quinine relativement concentrées (1/500). Et pourtant, on ne déce le pas de différences morphologiques entre les amibes d'eau douce et celles de l'eau de mer. On n'aperçoit pas non plus de différence au microscope entre les spirochètes de la fièvre récurrente et ceux qui se développent pendant la décomposition des végétaux ; ces derniers étant tués par une solution de quinine au 1/10.000 ». (Zunz) (104).

Parmi les différentes espèces d'amibes également, ces variations de sensibilité sont encore bien remarquées ; ainsi, nous avons pu observer au cours de nos expériences que *A. limax* présente une résistance particulière vis à vis des toxiques, ses mouvements si caractéristiques de reptation persistant dans des solutions alcaloïdes qui provoquent, chez les autres espèces, une immobilité complète suivie de mort.

On en déduit cette notion à peu près générale, que, même chez les organismes inférieurs, les différentes espèces d'un même groupe et les différents individus d'une même espèce réagissent différemment à l'action du toxique. Il résulte de là qu'une observation faite sur un seul organisme ne présente aucune signification et que, seules, les expériences portent sur des groupes nombreux d'individus, permettent de tirer des conclusions significatives. Il est facile de constater des faits de cette nature sur les animaux microscopiques les plus couramment observés dans l'eau douce : les amibes, les infusoires, les rotifères, les anguillules, tous sensibles à l'action de la quinine, présentent cependant toute une gamme de sensibilités différentes. L'action toxique se manifeste d'abord chez les infusoires, puis successivement chez les rotifères, les amibes et enfin chez le anguillules.

La plupart des auteurs qui ont étudié antérieurement l'action toxique de la quinine et d'autres alcaloïdes, vis à vis des protozoaires se sont adressés le plus souvent à des paramécies : (*P. caudatum*).

En 1925, Cantacuzene (A. et A.) (10) étudiant la sensibilité comparée de divers infusoires, vis à vis de la quinine et de la quinoïdine, trouvent que *P. caudatum* est moins sensible à ces toxiques que les spirostomes et plus sensible que les colpi-

dies. *P. caudatum* peut vivre dans une solution $M/2.10^5$ de chlorhydrate de quinine.

Deux années plus tard, Feiler (M.) (22) publie les résultats de ses recherches concernant l'action toxique de la quinine sur le même infusoire. Parmi les changements morphologiques qui surviennent chez les paramécies au cours de l'action de l'alcaloïde, cet auteur note principalement la vacuolisation intense du protoplasme observée auparavant par Prowazek (74).

En 1929, le même auteur étudie l'action obligodynamique de la quinine, d'après l'effet qu'elle exerce à différentes concentrations sur le taux de division des paramécies. Cette action se produit même dans le cas de solution très diluées ($N. 10^{-21}$) et l'on constate alors en fonction de la dilution, des alternatives de stimulation et de ralentissement sur le taux de division des infusoires.

En 1929, Roskin (Gr.) et Dune (Ed.) (84) observent que le protoplasme de *P. caudatum* possède la faculté, comme les constituants du système réticulo-endothélial, de fixer énergiquement les particules électro-négatives comme l'oxyde de fer et que ces particules qui n'exercent aucune action directe sur l'animal, modifient cependant son comportement vis à vis de la quinine, en le rendant plus sensible à l'effet de cet alcaloïde ; ces modifications seraient, semble-t-il, liées à la charge des particules.

Warasi (W.) (100) 1934, a montré que les paramécies étaient plus sensibles à l'action de la quinine que les autres protozoaires ; chez les espèces parasites, les hématozoaires, résistent moins bien à l'action du toxique que les trypanosomes et les autres parasites du plasma.

En 1933, Gause (G. F.) (25) publie les résultats de ses travaux sur la toxicité vis à vis de *P. caudatum*. En traçant la courbe logarithmique exprimant la relation entre la concentration des solutions utilisées et la durée moyenne de la vie des infusoires en expérience à ces concentrations, il constata que cette courbe était formée d'une succession de deux droites, la toxicité étant relativement moins élevée pour les fortes concentrations que pour les concentrations plus faibles. Nous verrons au cours du chapitre V, à propos de l'influence exercée par certaines substances sur l'action toxique de la quinine, vis à vis des amibes, que nous avons obtenu en certains cas des résultats semblables.

Tout récemment, Sarasi Lal Sarkar (87) a mis en évidence la sensibilité particulière que présentent les paramécies à l'action de la quinine et a constaté en outre que cette sensibilité

peut être accrue chez des infusoires soumis pendant un certain temps à l'action d'une solution de quinine relativement diluée. Cet état d'hypersensibilité qui, dès l'abord, semble s'opposer au phénomène d'accoutumance, nous avons eu l'occasion d'en vérifier la réalisation dans le cas des amibes.

2° Action sur les globules blancs :

L'action de la quinine sur les mouvements amiboïdes des globules blancs n'a donné lieu qu'à un petit nombre de travaux. Dans un article paru en 1927, Forti (C.) (23) constate que les alcaloïdes et la quinine en particulier, augmentent l'activité amiboïde des globules blancs de crapaud pour ensuite les paralyser.

3° Action sur les levures, les bactéries et les diastases :

L'action toxique de la quinine n'est pas limitée aux cellules animales ; cette substance exerce une action inhibitrice sur la croissance des levures et s'oppose au développement d'un certain nombre de bactéries (pneumocoque en particulier). Les diastases elle-mêmes (invertase, lipase) ont leur activité paralysée par l'effet de cet alcaloïde, et c'est peut-être là qu'il faut chercher la cause de l'effet toxique qu'exerce la quinine sur le protoplasme en général.

On a tenté d'expliquer l'action toxique de cet alcaloïde par une modification des oxydations cellulaires, et, pour essayer d'interpréter le mécanisme par lequel ces modifications prendraient naissance, deux hypothèses ont été émises :

a) La quinine se combinerait avec les constituants protéiques du cytoplasme,

b) L'alcaloïde se condensant sur la couche limitante cellulaire, diminuerait la quantité d'oxygène disponible au sein du cytoplasme.

On observe, en effet, certaines ressemblances dans l'aspect morphologique des animaux inférieurs ayant subi l'action de la quinine et l'aspect de ceux qu'on trouve dans un milieu pauvre en oxygène : c'est cette dernière théorie qui a été admise par la plupart des auteurs.

L'étude de l'action inhibitrice qu'exerce la quinine sur les ferments, a été traitée en détail par Rona et ses collaborateurs.

Ainsi, Rona (P.), Airila (Y.) et Lasnitzki (A.) (77) ont étudié cette action de l'alcaloïde sur la lipase du sérum et la lipase

hépatique ; ils ont trouvé que le sérum-lipase était beaucoup plus sensible à l'action inhibitrice, que la lipase hépatique, puisqu'il faut une dose de quinine deux mille fois plus faible dans le premier cas que dans le second.

En 1922, Rona et Bloch (79) étudiant l'action de la quinine sur l'uréase ont trouvé que cette action était liée au pH au milieu et plus forte dans la zone alcaline.

Successivement, Joachimoglu (G.) (36) en 1922, Rona et Grassheim (K.) (80) en 1923, Rona et Nicolaï (H.W.) (81) en 1927, et enfin, Meier (Rolf.) (56) au cours de la même année aboutirent à cette même conclusion que l'action de la quinine sur les cellules consistait principalement en une inhibition de la consommation d'oxygène. Ces auteurs constatèrent également qu'il y avait une grande différence entre les actions de la quinine sur les cellules et les ferments : les premières seules semblant obéir à la loi du « Tout ou Rien ». Cette réaction spéciale des cellules vis à vis de l'alcaloïde, amène les auteurs à penser que ces cellules possèdent un mécanisme de défense qui empêche le médicament de produire un effet avant que la concentration toxique soit atteinte.

4^e Action sur les tissus « *in vivo* » :

En 1923, Nitzescu et Cosma (I.) (63) étudiant le rôle de certaines substances, en particulier le chlorhydrate de quinine, sur la respiration tissulaire (muscles de grenouille ou muscles de bœuf entre autres), parviennent à cette conclusion que la quinine est un poison du protoplasme, dont l'effet antipyrétique est dû à son action inhibitrice sur la respiration des tissus, donc à un ralentissement des processus d'oxydo-réduction. Ils trouvent également que ce pouvoir inhibiteur est supérieur à celui des autres antipyrétiques et d'autres substances comme la morphine et la cocaïne.

Ces résultats sont confirmés trois ans plus tard par Meyer (E.) et Reinhold (A.) (57) et par un certain nombre d'auteurs japonais ; Hiramatsu (J.) (31) en 1931 — et Mizutani (K.) (60) en 1933 — ont constaté que la quinine diminue d'une façon notable la respiration tissulaire sur le foie, la rate, le cœur, les thyroïdes.

Cette action inhibitrice que possède l'alcaloïde vis à vis de la consommation d'oxygène des tissus expliquerait pour Warasi (W.) (100) les différences de sensibilités que présentent les hématozoaires et les trypanosomes, parasites du plasma : ces

différences résidant en l'affinité plus ou moins grande de ces protozoaires pour l'oxygène.

5° Action sur les tissus « *in vitro* » :

En 1930, Partachnikoff (M.) (69) a étudié l'action de la quinine sur la croissance et le métabolisme des tissus « *in vitro* » (culture pure de fibroblastes du cœur de l'embryon de poulet). En déterminant la surface des tissus en voie de croissance et évaluant l'intensité du métabolisme d'après la consommation du sucre du milieu, l'auteur a observé qu'une solution de chlorhydrate de quinine à 1/5.000 rend impossible la croissance du tissu, alors que le métabolisme des glucides n'est diminué que de 50 % environ de sa valeur. Avec une solution 1/2.500, le métabolisme est annulé.

§ II. — INFLUENCE DE DIFFERENTS FACTEURS SUR L'ACTION PHYSIOLOGIQUE DE LA QUININE

1° pH des solutions :

En 1923, Henry (T. A.) et Brown (H. C.) (29) étudiant l'influence de la réaction du milieu sur la toxicité des alcaloïdes et de la quinine en particulier vis-à-vis des protozoaires, constatent que les solutions alcalines de cet alcaloïde sont plus actives que les solutions acides.

Quelques années plus tard, en 1928, Mayeda (S.) (54) expérimentant sur les colpidies, confirme ces résultats et arrive à cette conclusion que la toxicité des sels de quinine est liée à la proportion de base alcaloïdique libre, l'action toxique étant plus élevée en milieu alcalin qu'en milieu acide.

Cependant, cette opinion jusqu'alors généralement admise n'est pas acceptée par Roskin (Gr.) et Dune (Ed.) (84) qui, en 1929, sont amenés à constater que *P. caudatum* présentait une sensibilité particulière quand il était « bloqué » par des particules de fer colloïdal en milieu acide.

Mais en 1934, Goljachowski (N. W.) (26) étudiant en fonction d'un pH l'action toxique du chlorhydrate de quinine sur le cœur isolé de grenouille arrive à la même conclusion que Mayeda (S.) (54) et les précédents auteurs : à savoir que cette action toxique est plus élevée en milieu alcalin.

Au cours du chapitre IV, nous aurons l'occasion d'exami-

ner plus longuement l'influence qu'exerce le pH sur la toxicité de la quinine pour les amibes.

2° Influence des radiations lumineuses.

a) LUMIÈRE VISIBLE : depuis les recherches que Von Tappeiner (98), Iodlbauer et Straub — 1912 — (91) sur les œufs de grenouille et les ferments, on sait que la quinine est plus toxique à la lumière qu'à l'obscurité.

Macht fait des constatations analogues sur la grenouille.

Macht et Teagraden (E. J.) (Jr.) (50) opèrent sur les rats et leur injectent du sulfate de quinine et de quinidine ; les animaux exposés à la lumière ou aux radiations ultra-violettes des lampes de quartz montrent une sensibilité accrue par rapport à ceux qui sont maintenus à l'obscurité.

b) RADIATIONS ULTRA-VIOLETTES : un certain nombre d'auteurs ont étudié l'action de l'irradiation ultra-violette sur la toxicité de la quinine, et la plupart d'entre eux sont arrivés à cette conclusion que dans de telles conditions la toxicité est augmentée.

Nous venons de voir que Macht et Teagraden (50) avaient opéré également en lumière ultra-violette. En 1929, Roskin et Romanova (K.) (85) mettent en évidence l'augmentation très nette de la toxicité de la quinine sur les infusoires en présence de rayons ultra-violets. Toutefois, ces résultats n'ont pas été confirmés par Jirovec (C.) et Bouse (V.).

On a voulu voir une relation entre la fluorescence des solutions de quinine et leur toxicité, et il en serait de même pour d'autres substances chimique (éosine, dérivés de l'acridine, etc.) Les substances fluorescentes absorbent l'énergie lumineuse; tant qu'elles possèdent cette énergie emmagasinée, elles détruisent le protoplasme des cellules vivantes, les toxines, les enzymes (Zunz) (104).

A l'appui de ces théories, Milanesi (E.) (58) en 1928 remarque que l'activité du sulfate de quinine est en rapport avec sa fluorescence, le sulfate étant d'autre part, d'après l'auteur, le seul sel de quinine présentant une fluorescence en lumière solaire, fluorescence qui est encore plus vive sous l'action des radiations ultra-violettes.

3° Substances photosensibilisatrices :

Ces substances peuvent également, selon certains auteurs, augmenter d'une façon notable la toxicité de la quinine pour

les protozoaires: c'est ce qu'à montré Rusznyak (S.) (86) en 1920, en étudiant l'influence exercée par la fluorescéine et l'éosine sur l'action toxique de la quinine employée dans la malaria.

§ III. — FIXATION DE LA QUININE SUR LES CELLULES

A propos de la toxicité de la quinine, vis à vis des êtres unicellulaires, nous ne pouvons passer sous silence les travaux concernant la fixation de cet alcaloïde sur les cellules et, en particulier, les hématies.

C'est en 1925, qu'au cours de leurs recherches sur l'hémolyse R. Fabre et Simonnet (20) ont été amenés à considérer le rôle des hématies dans la fixation de la quinine.

Quelques années plus tard, en 1929-1930, R. Fabre et L. Binet (19 *bis*) reprennent la question et envisagent en premier lieu la fixation de l'alcaloïde sur les globules rouges, puis sa répartition entre les hématies et le plasma. A la suite de leurs expériences, ces auteurs ont pu faire ressortir le rôle prédominant des hématies dans la fixation de certains produits médicamenteux et de la quinine en particulier. Ils ont montré également que cette fixation de l'alcaloïde si nette « *in vivo* », l'est beaucoup moins dans le cas où l'on opère « *in vitro* », par mélange de la solution du sel de quinine avec du sang défibriné. P. Fourment et H. Hermann (23) ont apporté la confirmation de ces résultats par des observations microscopiques.

Il ressort de tous ces travaux que si la spécificité de la quinine comme poison protoplasmique est actuellement bien établie, le mécanisme de sa fixation et de son action sur la cellule vivante, les réactions des différents constituants de cette cellule vis à vis de l'alcaloïde, n'ont pas fait l'objet d'un grand nombre de travaux.

Deux questions méritaient d'être étudiées à propos de l'action pharmacodynamique des alcaloïdes en général et de la quinine en particulier.

1° De quelle manière l'alcaloïde se fixe-t-il sur la cellule réceptrice ? Y a-t-il une localisation superficielle ou véritable pénétration dans le protoplasme ?

2° Quelles sont les modifications produites dans la cellule à la suite de la fixation de l'alcaloïde ?

La première question avait été résolue en partie par le travail de G. Valette.

En 1935 cet auteur entreprit d'étudier les modalités de la fixation de la quinine chez les protozoaires, par l'examen microscopique de la fluorescence obtenue au moyen de solutions sulfuriques de cet alcaloïde. En observant à l'aide du microscope à fluorescence de Reichert, des paramécies (*P. caudatum*) placées entre lame et lamelle dans une solution de sulfate de quinine, il constata, au bout d'un temps très court, l'apparition des plages lumineuses circulant à l'intérieur du protozoaire et augmentant d'intensité jusqu'à se détacher en bleu intense sur le fond obscur de la préparation. Or, ces sphères lumineuses n'étant autre que les vacuoles digestives, l'auteur conclut à une fixation élective de la quinine sur le vacuome, où se produit une condensation de l'alcaloïde ; il put comparer alors ce phénomène avec celui qui a lieu dans le cas de la fixation du rouge neutre sur la cellule du protozoaire, la substance étrangère se localisant dans les deux cas au niveau des mêmes inclusions protoplasmiques.

Déjà Jancso (N. V.) (97) en 1932 utilisant les propriétés de fluorescence de certains dérivés de l'acridine et de la styrylquinoléine et pyroléine constatait la fixation de ces substances sur les trypanosomes ; en observant, en effet, au microscope à fluorescence des trypanosomes préalablement maintenus en contact avec de fortes doses de substances en question, l'auteur constate que ces protozoaires deviennent lumineux avec une teinte de fluorescence caractéristique. Les flagellés se présentent colorés en rouge-jaune-verdâtre, « comme de petites lampes qui bougent sur le champ bleu foncé ». Il put ainsi en déduire que les substances chimiothérapiques pénétraient dans le corps du parasite où elles sont accumulées. Il put aussi par cette méthode constater que la résistance particulière de certaines souches de trypanosomes aux agents thérapeutiques est liée au fait que la substance curative ne peut pénétrer à l'intérieur de la cellule ; ces organismes, en effet, restent invisibles après administration de fortes doses des agents chimiothérapiques auxquels ils sont résistants (arsenic, trypaflavine).

C'est en partant de ces résultats que nous avons entrepris de préciser les conditions de fixation de la quinine dans les protozoaires, en étudiant en fonction de la concentration des solutions, les modalités de la pénétration du toxique et les conditions de l'intoxication des cellules envisagées.

CHAPITRE II

Culture et Isolement des Amibes

Pour mener à bien nos recherches, il nous fallait, en premier lieu, réaliser une condition indispensable, à savoir l'obtention des amibes en grand nombre. Nous avons été conduit à choisir une amibe commune de l'eau douce ou de la terre, de préférence à une espèce parasite, étant données les difficultés d'isolement et de culture de ces dernières.

Les amibes communes, marines et terrestres, constituent dans l'ensemble un groupe assez peu étudié et dont la classification a subi, suivant les auteurs, de nombreux changements. Leur caractère essentiellement plastique et le polymorphisme apparent qui en résulte a prêté à beaucoup de confusions.

Les nombreux milieux préconisés pour la culture des amibes, ne sont pas tous également favorables à leur développement. Il était indispensable pour nos recherches de réaliser des cultures très riches pouvant donner naissance à des individus de taille aussi grande que possible.

Disons tout de suite, que nous avons dû écarter l'idée d'entreprendre des cultures pures d'amibes, d'abord parce que cela ne nous était pas indispensable et qu'ensuite ces cultures, en général longues et délicates, sont relativement très pauvres ; les espèces qu'on y trouve sont, le plus souvent d'ailleurs, de petite taille. Les conditions réalisées dans ces cultures, s'éloignent, en effet, des conditions naturelles, et créent chez le protozoaire un état de défense : diminution de taille, tendance à l'enkystement et régression de la multiplication.

Nous devons éviter cependant de tomber dans l'excès contraire, c'est-à-dire ne pas obtenir des milieux trop riches en flore et en faune associées (bactéries, champignons, infusoires, etc.) le développement trop intensif de ces autres espèces gêne la reproduction des amibes et inhibe leur croissance.

D'autre part, les cultures faites sur divers milieux deman-

dent pour arriver à maturité, c'est-à-dire à leur maximum de développement, un certain nombre de jours, nombre qui sera à peu près toujours le même si les cultures sont faites de façon identique. Les amibes arrivées à cet optimum de croissance conservent leur forme pendant une semaine environ ; un repiquage s'impose alors, les milieux ne présentant plus les conditions nécessaires au développement des amibes. Pour obtenir celles-ci d'une façon suivie il est donc nécessaire de faire des cultures en séries, à des intervalles de temps tels qu'elles atteignent leur optimum les unes après les autres.

Dans la rédaction de ce chapitre, nous passerons d'abord en revue les différents milieux préconisés par les principaux auteurs qui se sont intéressés à la culture des amibes, nous en ferons l'étude critique et nous insisterons plus particulièrement sur la méthode qui nous a donné les meilleurs résultats. Nous montrerons ensuite comment nous avons pu isoler et identifier une variété d'*Amœba proteus* Leidy se rapprochant beaucoup de l'amibe décrite par Schaeffer sous le nom d'*Amœba dubia* (*Amœba proteus* de Penard).

L'identification d'une amibe commune n'est pas chose aisée, car, si les ouvrages concernant les amibes pathogènes sont très répandus, nous en trouvons très peu qui traitent des amibes communes. La plupart des espèces communes ont des dimensions variant entre 25/30 μ (*A. guttula*) et 100 μ et se prêtent peu à une observation précise. Cependant, certaines espèces peuvent atteindre jusqu'à 600 μ et même 1.200 μ (*A. proteus* Schaeffer) présentant toutes les conditions requises pour une observation détaillée de leur constitution.

PRÉLÈVEMENT : Les amibes communes se trouvent, en général, dans tous les endroits humides d'où on peut aisément les prélever. On les rencontre dans les mares, dans la boue mélangée de détritux végétaux existant au fond des fossés, la mousse qui recouvre les rochers humides, la terre de jardin, le fumier, etc... Les amibes recueillies dans ces différents produits sont réensemencées sur des milieux convenables en même temps que les bactéries et les nombreux microorganismes avec lesquels elles sont toujours mélangées. Pour repiquer le plus grand nombre d'amibes possible on peut centrifuger les eaux recueillies et commencer le culot, ou bien, comme le conseillent Schaudin et Eyferth, jeter dans ces eaux des lamelles de verre que l'on retire au bout de quelques heures, couvertes d'amibes. Enfin, on peut simplement laisser reposer les eaux prélevées, à une température de 22/24° environ ; elles viennent à la surface et on

peut alors les séparer du reste du liquide. Les résultats que nous avons obtenus en essayant à plusieurs reprises la méthode des lames immergées pour l'isolement des amibes, se sont toujours montrés incertains et même insuffisants. Nous avons même essayé sous le microscope, de faire passer les amibes sur des tiges de verre extrêmement fines dans le but de les isoler de tous les autres êtres microscopiques présents dans le milieu, mais sans grand succès. D'ailleurs, le plus souvent, l'amibe au contact de ce corps étranger, se contractait brusquement, diminuant ainsi de volume et restant pendant un certain temps dans une immobilité complète.

§ I. — MILIEUX DE CULTURE

Lorsque l'on veut obtenir des amibes en grand nombre et que l'on ensemence quelques spécimens de la variété choisie sur des milieux convenables, il est indispensable de favoriser dans le milieu de culture le développement des bactéries et des micro-organismes divers nécessaires à la nourriture de ces rhizopodes. En général, ces deux opérations se font simultanément, les culots ensemencés contenant à côté des amibes normales ou enkystées une grande variété de microbes et de protozoaires.

Nous avons vu précédemment que les cultures pures d'amibes n'étaient pas favorables d'une part à l'obtention d'amibes de grande taille et d'autre part à la reproduction intense de celles-ci. Cette reproduction se fait, dans le cas de ces protozoaires, le plus souvent par deux processus différents :

1° La scissiparité, reproduction asexuée où chaque individu donne naissance après bipartition du noyau à deux amibes-filles.

2° La sporogonie ou autogamie, reproduction sexuée ; le syncarion formé, qui dans le cas des espèces parasites se partage en huit noyaux secondaires, se divise en un nombre beaucoup plus considérable chez les espèces libres. Cette multitude de sporozoïtes libérés grossiront et donneront naissance chacun, si les conditions du milieu ambiant le permettent, à une amibe. Ce dernier mode de reproduction qui, chez les espèces parasites, permet leur expulsion au dehors créant ainsi des possibilités d'infestation, est le plus intéressant dans le cas des amibes communes, pour l'obtention de cultures riches.

Cette théorie n'est cependant pas acceptée par Johnson (P.) (37) qui affirme que chez *A. proteus* surtout, le seul fait bien établi est la reproduction par bipartition ; les autres modes décrits par

différents auteurs (mitose, conjugaison, autogamie, sporulation, bourgeonnement) s'appliqueraient plutôt à d'autres espèces d'amibes ou de protozoaires parasites. Cependant nous verrons plus loin que, dans les milieux liquides, en particulier le milieu au blé, nous avons observé que la reproduction se faisait bien par sporulation.

Les milieux employés pour la culture et la conservation des amibes communes au laboratoire sont fort nombreux, leur composition étant moins spécifique et les conditions à réaliser moins sévères que pour les amibes pathogènes. On peut les diviser en milieux liquides et milieux solides :

A. — MILIEUX SOLIDES : Très employés auparavant pour la culture des amibes, il en existe dans la littérature une grande diversité. La plupart d'entre eux cependant s'adressent à la culture des espèces pathogènes. Nous citerons simplement les principaux d'entre eux, qui ont été préconisés pour la culture des amibes communes.

1. — Gelée de carraghen additionnée d'une petite quantité de bouillon, préconisée par Mouton (H.) (61) ; l'auteur alcalinise fortement pour éviter une pullulation microbienne trop importante.

2. — Gélose pauvre en matières nutritives, sur laquelle nous reviendrons plus loin.

3. — Gélose nutritive de Gauducheau (1912) (2% de gélose nutritive et 1% de peptone) ; cet auteur emploie également des pommes de terre, du sérum coagulé, du jaune d'œuf.

4. — On a préconisé enfin un grand nombre de milieux gélosés qui ne diffèrent entre eux que par la diversité des produits accessoires qui y sont ajoutés.

B. — MILIEUX LIQUIDES : Malgré l'opinion de Gauducheau, qui a remarqué que les milieux liquides n'étaient pas favorables aux cultures, nous préférons cependant ces milieux liquides dont le rendement est plus élevé et l'emploi plus facile. Ces milieux qui ont surtout servi pour la culture de *A. proteus* sont d'inégale valeur. Nous avons tout d'abord essayé le milieu au foin de Wasielewsky et Hirschfeld (99) ; au bout de 5 à 8 jours, nous n'avons obtenu qu'un voile peu important, et peu riche en amibes, il nous a surtout donné un développement intense d'infusaires de toutes sortes.

Les autres milieux liquides, principalement le milieu au blé de K. Suydam Brehme (92), le milieu au foin de Hopkins (D.L.) et Johnson (P.L.) (33), sur lesquels nous insisterons plus particulièrement, nous ont donné de bons rendements.

Nous allons maintenant décrire les trois milieux que nous avons utilisés pour la culture de *A. dubia* en les classant par ordre de rendement croissant :

1° Le milieu gélosé, employé par Mouton (H.) dans ses recherches sur la digestion chez les amibes et sur leur diastase intracellulaire se prépare avec de la gélose privée de toute substance nutritive soluble à froid, par plusieurs lavages à l'eau distillée ; les premiers lavages comportant un contact de quelques heures. Cette gélose lavée et essorée est mise à sécher sur plusieurs plaques de verre légèrement paraffinées, dans une étuve dont la température ne dépasse pas 60 à 70° C. Avec le produit sec obtenu, on fait une gelée dans la proportion de 2 gr. 50 % dans eau distillée ; les premiers essais que nous avons effectués avec une gelée à 2%, conseillée par la plupart des auteurs, nous a donné un produit peu consistant, se fragmentant facilement ; la proportion de 3% a donné au contraire une gelée trop consistante et dont la surface se dessèche facilement. Le liquide obtenu par stérilisation à l'autoclave, 35 minutes à 120°C et filtré encore chaud sur filtre Chardin est laissé au refroidissement jusque vers 70° environ ; on alcalinise fortement à ce moment par de la soude diluée en présence de papier de tournesol jusqu'à $\text{pH} = 8$ ou 8,2 environ. Les ouvrages qui donnent la composition de ce milieu ne fournissent aucune précision sur cette alcalinisation. Cette phase de la préparation est cependant d'une grande importance, puisque d'elle dépend la richesse des cultures. Or, une simple neutralisation permet un développement bactérien abondant nuisible à la croissance des amibes ; au contraire, une trop forte alcalinisation est favorable au développement d'algues et d'organismes microscopiques, et il en résulte une dessiccation rapide de la surface de la culture sur laquelle les amibes s'enkystent rapidement. Nous croyons qu'il est préférable d'ajuster le milieu aussi exactement que possible, à la valeur indiquée plus haut de 8,0 à 8,2. Cette alcalinisation que la plupart des auteurs font avec de la soude peut se faire également avec de la potasse (Hopkins et Johnson). Le milieu encore liquide et chaud est coulé immédiatement dans des boîtes de Pétri sur une hauteur de 1 à 2 centimètres environ, ou mieux dans les fioles d'Erlenmeyer d'une contenance de 500 cm³ et sur une hauteur de 2 centimètres environ. Ces récipients ont l'avantage d'éviter une trop grande évaporation de l'eau de la culture et par conséquent d'éviter la dessiccation rapide de sa surface. Les amibes exigent en effet, pour se développer normalement, un degré constant d'humidité, qui ne doit pas être excessif cependant.

On ensemente ces cultures soit avec l'eau de lavage d'une culture ancienne, soit avec des eaux de mares ou de flaques stagnantes, soit enfin avec le produit glaireux résultant du râclage de la face immergée des feuilles de nénuphar et de différentes plantes aquatiques, mais il est encore préférable d'utiliser pour cet ensemenement le produit résultant du lavage de la terre de jardin, la suspension obtenue étant préalablement laissée en repos pendant quelques minutes, pour permettre le dépôt des grosses particules.

Les cultures sont mises à l'étuve à une température de 22 à 24° C, et l'on examine le développement au bout du douzième ou quinzième jour. Il faut surveiller journallement les cultures et s'assurer qu'elles sont suffisamment humides ; le mieux est de les conserver en atmosphère saturée de vapeur d'eau, soit dans une chambre humide, soit dans une étuve renfermant un grand cristalliseur rempli d'eau.

Ce milieu sur lequel les amibes peuvent vivre très longtemps, si les conditions de température et d'humidité sont respectées, ne nous a cependant pas donné de très bons résultats. Nous lui préférons de beaucoup les deux milieux dont nous donnons ci-après la description :

2° Milieu au foin (Hopkins (D.L.) et Johnson (P.L.) (33). Ces auteurs se sont intéressés particulièrement à la composition saline de ce milieu de culture. Ils avaient remarqué que, parmi toutes les formules décrites, « aucune attention n'avait été accordée à la composition saline du milieu utilisé » et la composition en sels minéraux des différents produits naturels employés couramment (foin, paille, terre, etc.) ne correspond nullement aux proportions relatives qui sont favorables au développement des amibes.

Sans nous étendre sur les études de ces auteurs au sujet de l'adaptation progressive et nécessaire des amibes dans les milieux salins, donnons un aperçu du milieu qu'ils ont pu établir après bon nombre d'expériences. La composition saline de base est la suivante :

Chlorure de calcium	0,02219 gr.	0,0002 M
Chlorure de sodium	0,23380 gr.	0,004 M
Potasse	0,0499 gr.	0,00088M
Phosphate monopotassique	0,34030 gr.	0,0025 M
Extrait de foin dialysé		10 cc.
Eau		q.s. p. 1.000 cc.

Nous voyons que dans la composition de ce milieu, les auteurs utilisent de l'extrait de foin dialysé : « c'est que, disent-

ils, la composition saline du foin n'est pas toujours constante... et qu'il apparaît dans l'analyse de cette composition, qu'un nombre considérable de substances physiologiquement actives sont introduites dans les cultures d'amibes avec le foin, causant ainsi des modifications de la composition du milieu. »

Deux méthodes ont été utilisées pour extraire les matières salines du foin. Nous ne décrirons en détail que la méthode de Loeb, qui est celle que nous avons employée :

75 grammes de foin finement broyé au moulin sont traités à deux reprises par 1 litre 1/2 d'eau distillée ; le foin étant remis en contact avec 1 litre 1/2 d'eau distillée, on l'amène à pH : 8,0 par l'addition de 60 cm³ de potasse N/20. Les liquides de lavage sont réunis et on traite le foin résiduel avec de l'eau distillée jusqu'à ce que les liquides aient un pH égal à 6,6. Ce foin est à nouveau remis en contact avec de l'eau distillée et l'on ajoute 10 cm³ d'acide chlorhydrique N/5 pour amener à pH : 4,5. On filtre alors la suspension obtenue et on lave le foin resté sur le filtre jusqu'à ce que les eaux de lavage atteignent un pH de 5,8. Le foin desséché à l'étuve à 50° ne contient plus que 1,1 % de matières minérales. L'ensemble des liquides de lavage constitue l'extrait de foin dialysé utilisé dans la préparation du milieu.

Cette méthode a cependant un inconvénient : elle déplace une quantité considérable de matières organiques. Aussi, pour obvier à cet inconvénient, les auteurs ont employé de préférence la méthode de Levingstone, par électro-dialyse. Le foin obtenu par cette méthode, séché à l'étuve ne contient plus, d'après Hopkins et Johnson, que 1,3 % de cendres.

3° MILIEU AU BLÉ : Ce milieu qui nous a donné les meilleurs résultats (amibes abondantes et de grande taille) a été préconisé par K. Suydam Brehme (92) au cours de ses études sur la fusion protoplasmique chez *A. proteus* :

— Un litre d'eau distillée ou d'eau de source, contenant 25 grains de blé, est porté à l'ébullition pendant quelques minutes. Après refroidissement, on verse le milieu dans des cristallisoirs (dish butter glass) et on ajoute dans chacun deux grains de blé cuits, une certaine quantité d'algues vertes, et on laisse 24 heures en repos avant d'ensemencer avec des *A. proteus*. L'ensemencement fait, on conserve les cultures soit à l'étuve, à 22/24°, soit à la température du laboratoire (20° environ). L'évolution de ces cultures est la suivante :

Les amibesensemencées se conservent dans le milieu pendant quelques jours en diminuant cependant de taille, puis elles disparaissent complètement. Si on examine une culture au bout

du vingtième jour, on aperçoit à côté des nombreux protozoaires et autres microorganismes qui s'y sont développés, une infinité de petites sphères remplies d'une substance granuleuse. Si, à partir de ce moment, on suit tous les jours le développement des cultures, on constate que ces petites sphères grossissent peu à peu, se transforment ensuite en kystes et, vers le 28°/35° jour, la culture est très riche en amibes de taille normale. Le pH du milieu examiné à ce moment a une valeur de 7,4 à 7,6. Les amibes ainsi obtenues, examinées en détail, présentent toutes la forme caractéristique de *A. dubia*, dont nous donnons un peu plus loin la description.

Au fur et à mesure que les cultures vieillissent, le milieu liquide devient plus visqueux et plus épais, et l'on est obligé, au bout de quelques jours, de faire des repiquages sur des milieux neufs.

§ II. — DIFFERENTES ESPECES D'AMIBES ETUDIEES ET CARACTERISATION DE *A. DUBIA*

1° *A. dubia*. — Nos premières études faites sur milieu gélosé etensemencées avec le produit de centrifugation de l'eau stagnante recueillie dans les bassins de la Faculté de Pharmacie de Paris (vase du fond mélangée de détritux végétaux, couche glaireuse de la face inférieure des feuilles flottantes et immergées) ne nous ont donné que des amibes peu nombreuses et de petite taille (*A. limax* surtout), mais, par contre, une grande abondance d'anguillules, de rotifères, et d'infusoires de toutes sortes.

Nous avons alorsensemencé d'autres cultures avec le produit de lavage de la terre humide de jardin. Au bout de 15 à 20 jours, nous avons pu voir des amibes nouvelles, de taille moyenne, peu bourrées de matières nutritives, et se déplaçant à une allure assez rapide. De forme palmée, ces amibes possédaient à leur partie antérieure une bande assez large d'ectoplasme hyalin avec quelques pseudopodes courts terminaux. Délaissant le milieu gélosé, nous les avons réensemencées sur le milieu au foin et le milieu au blé.

Contrairement à ce que nous avons vu dans le cas du milieu au blé, les amibes ne disparaissent jamais complètement des milieux au foin. Nous en déduisons donc que la reproduction dans ce milieu se fait exclusivement par scissiparité. De plus, ces cultures, même à leur pleine maturité, ne sont jamais très riches

en amibes et celles-ci n'atteignent jamais la taille qu'elles ont dans le milieu au blé. Cependant, elles possèdent sur ce dernier milieu, trois avantages précieux :

1° Les amibes qui s'y sont développées présentent la forme caractéristique de *A. dubia*, alors que celles obtenues dans le milieu au blé sont plutôt polymorphes ;

2° Elles se conservent beaucoup plus longtemps sans s'enkyster, le milieu gardant pendant un temps relativement long les conditions optimum de culture.

3° Enfin, la flore et la faune associées, si abondantes dans le cas du milieu au blé sont ici peu abondantes.

Cependant, bien que les amibes obtenues dans ces deux cultures présentent un aspect différent, il s'agit d'une seule et même espèce : en effet, les individus prélevés dans le milieu au blé et repiqués sur le milieu au foin donnent dans ces conditions, au bout de quelques jours, les formes caractéristiques rencontrées dans le milieu au foin ; et inversement, les individus prélevés sur ce milieu au foin et mis en culture dans le milieu au blé donnent, au bout de 25/30 jours, par le même processus de sporogonie que nous avons déjà décrit, de belles amibes présentant l'aspect caractéristique du milieu au blé. Enfin, si l'on prélève des individus dans les deux milieux à la fois et qu'on les lave par trois fois avec de l'eau bi-distillée (centrifugations et décantations) on obtient au bout de 24 heures environ des amibes identiques. Or, cette espèce, qui présente les mêmes caractères que *A. proteus* de Leidy se rapproche encore plus de *A. proteus* de Penard (71) décrite en détail par Schaeffer (88) sous le nom de *A. dubia*. Voici d'ailleurs la définition donnée par Leidy pour *A. proteus* :

« Espèce assez grande comparativement, presque incolore, « plus ou moins sombre en lumière transmise et jaune pâle en « lumière réfléchie. Sphérique ou ovoïde quand elle est au repos, « très variable et changeant constamment de forme quand elle « se meut, ordinairement de forme « rameuse », palmée ou « radiée. Elle progresse assez rapidement et a tendance à se « différencier en partie postérieure et antérieure. Pseudopodes « gités, simples ou rameux et arrondis, quelquefois effilés et poin- « tus. Noyau souvent unique, discoïde, situé le plus souvent à la « partie postérieure ; vésicule contractile assez grande, le plus « souvent unique, située dans la plupart des cas derrière le « noyau. Ectoplasme mince et différencié ; endoplasme finement « granuleux en général, contenant des éléments variés et con- « tribuant à la formation des pseudopodes par écoulement.

« Le noyau a la forme d'un corps sphérique aplati comprimé et épais, entouré d'un halo clair constitué par du cytoplasme transparent. »

A. proteus (Leidy) mesure environ 600 μ de long mais peut atteindre exceptionnellement 1.200 μ ; on la voit dans ce cas à l'œil nu déployer ses pseudopodes. La caractéristique principale de cette amibe est due à la présence de fissures ou replis longitudinaux à la surface des pseudopodes (crêtes) quand l'amibe se déplace. C'est cette particularité d'ailleurs, qui différencie *A. proteus*, Leidy des deux autres espèces décrites par Schaeffer : *A. discoïdes* et *A. dubia*.

Ces deux espèces ne diffèrent d'ailleurs que par quelques caractères secondaires :

A. discoïdes : a une taille de 400 μ environ quand elle se déplace ; change souvent de forme. Elle présente plusieurs pseudopodes en forme de massue, de section transversale arrondie avec un seul courant d'endoplasme bien coordonné (différence avec *A. proteus*). On y voit ni fissures, ni crêtes longitudinales. Noyau toujours arrondi, à surface lisse, sans repli. Les côtés du disque sont légèrement concaves, aplatis, ou un peu convexes. La chromatine est répartie sous forme de milliers de petites masses situées immédiatement sous la membrane nucléaire, presque toujours uninucléée, rarement binucléée. Une seule vacuole contractile localisée à la partie postérieure. Bleuâtre à faible grossissement, cette amibe ressemble beaucoup à *A. proteus*.

A. dubia (*A. proteus* de Penard) : change souvent de forme quand elle se meut sur une surface plane ; elle est étoilée ou largement palmée ; pseudopodes souvent nombreux et divergents à partir d'une masse centrale de cytoplasme, à peu près égaux, élargis par une extension uniforme des côtés, leur surface est unie ; l'endoplasme, transparent et hyalin, est d'une teinte légèrement jaunâtre quand il n'est pas bourré d'aliments. Le noyau typique est presque discoïde ou légèrement aplati ; la chromatine comme dans le cas de *A. discoïdes*, est formée de milliers de particules réparties immédiatement sous la masse nucléaire : dimensions : 42 μ de long et 32 μ de large... Une ou plusieurs vésicules contractiles, généralement très grandes, localisées ordinairement dans la moitié postérieure de l'amibe.

C'est peut-être la plus commune des grandes amibes. Elle fournit un sujet d'étude intéressant, étant donné sa transparence. Elle contient ordinairement peu de cristaux et, quand elle n'est pas trop bourrée de particules alimentaires, on peut observer facilement les mouvements du protoplasme et les contractions de

la vésicule contractile. Sa taille moyenne est de 400 μ . Exceptionnellement binuclée et mesurant alors 400 μ de large et 1.000 μ de long. Diffère pratiquement de toutes les autres grandes amibes par le nombre de ses pseudopodes qui naissent dans toutes les directions, sauf à la partie postérieure où il s'en forme rarement.

Schaeffer lui a donné le nom de *dubia* parce qu'on a l'impression que l'amibe hésite à choisir le pseudopode où elle va s'engager. Son noyau, décrit par Penard, est ovoïde ou elliptique et mesure 40 μ de long et 32 μ de large à l'équateur ; quelquefois, il est festonné ou denté. Ce noyau peut se trouver n'importe où dans l'endoplasme, mais est situé le plus souvent comme la vésicule contractile, dans la moitié postérieure de la cellule.

Nous allons maintenant essayer de décrire, d'une façon aussi exacte que possible, la variété que nous avons cultivée, et qui nous a servi pour nos expériences. Nous avons vu précédemment que cette amibe, sur deux milieux divers, présentait des aspects morphologiques différents. Ceci n'est d'ailleurs pas pour nous étonner, car c'est un fait bien connu que les conditions environnantes influent sur la structure des êtres vivants. Nous allons cependant, pour notre description, choisir la forme plus caractéristique du milieu au foin.

Cette amibe mesure, environ, 250 μ de long sur 200 μ de large (nous en avons rencontré, exceptionnellement, de 400 à 500 μ). De taille comparativement très grande, mais qui est encore loin d'atteindre celle des amibes des auteurs américains, qui mesurent de 800 à 1.200 μ . Palmée plus souvent qu'étoilée pendant sa reptation, elle affecte souvent une forme d'éventail avec tendance nette à se différencier en partie postérieure et antérieure. La partie antérieure élargie est bordée d'une large bande d'ectoplasme hyalin qui donne naissance à des pseudopodes courts à sommet arrondi et à base élargie. La partie postérieure plus rétrécie, est bordée latéralement par une mince bande d'ectoplasme, de telle sorte que l'endoplasme semble à ce niveau être directement en contact avec le milieu extérieur. Quand il n'est pas trop bourré d'aliments, l'endoplasme assez transparent laisse aisément voir au gros grossissement sa constitution interne. Vacuoles digestives assez nombreuses et de dimensions inégales ; vésicule contractile relativement grande, le plus souvent unique chez l'amibe normale et localisée généralement à la partie postérieure. Noyau discoïde ou légèrement aplati, rarement elliptique ; la membrane nucléaire est nettement visible et la substance chromatique est répartie en trois ou quatre masses inégales aisément perceptibles à un fort grossissement. Généralement localisé

à la partie postérieure, le noyau peut se trouver cependant dans toutes les parties de l'endoplasme.

Dans un milieu où l'amibe trouve une nourriture abondante, son protoplasme est bourré de particules alimentaires de taille et de forme variées, et c'est pour cette raison que toutes nos observations ont été faites sur des amibes mises à jeuner depuis 24 heures environ. Leur opacité diminue ainsi et leur structure devient plus visible. L'amibe en déplacement envoie toujours plusieurs pseudopodes à sa partie antérieure ou frontale ; puis elle semble hésiter un instant et s'écoule enfin dans l'un des pseudopodes, pendant que les autres se rétractent lentement. C'est cette hésitation qu'elle présente à choisir une voie déterminée pour progresser qui lui a valu le nom de *dubia* donné par Schaeffer. A la vérité, et quoique la reptation ne soit pas aussi régulière et uniforme que chez *A. limax*, le temps d'hésitation était très court chez l'espèce que nous avons utilisée. Dans les cultures riches, en algues et champignons de toutes sortes, les amibes en se déplaçant, traînent souvent à leur partie postérieure un petit bouquet terminal constitué par des débris végétaux qui semblent y adhérer fortement. Ce bouquet serait, d'après certains auteurs, une touffe d'hyphes provenant de la germination de spores incluses dans le protoplasme et qui aurait poussé à l'extérieur ; les thalles ayant perforé la couche limitante cellulaire. D'ailleurs, Leidy se fondant sur ce caractère, a créé le groupe spécial des *Ourameba*, ou amibes à queue.

INCLUSIONS : Les particules alimentaires qui, dans les milieux très riches, encombrant le protoplasme de l'amibe ont, comme nous l'avons vu, des formes et des dimensions différentes :

On y rencontre par ordre de dimensions croissantes :

a) De fines granulations réparties dans toute la masse de l'endoplasme.

b) De nombreux corpuscules arrondis, très réfringents, répartis également d'une manière uniforme dans l'endoplasme. Il en existe cependant dans les vacuoles digestives : ce sont les corps réfringents.

c) Des cristaux de formes variées, relativement rares dans l'endoplasme et assez nombreux au contraire dans les vacuoles.

d) Enfin, on rencontre également dans l'endoplasme des corpuscules arrondis, plus gros que les corps réfringents, qui disparaissent assez rapidement quand l'amibe jeûne.

Nous allons maintenant passer en revue ces différentes inclusions, dont Mast (S.O.) et Doyle (W.L.) (52) ont fait une étude très détaillée.

a) Les fines granulations que nous avons rencontrées uniformément réparties dans l'endoplasme, et de petite taille, sont désignées par Bast (1925) sous le nom de « granules B ». Selon cet auteur, elles mesureraient environ 1μ de diamètre et seraient probablement les homologues des grains trouvés dans la structure d'autres organismes et appelés « cytomicrosomes » et « plastosomes » par Duesberg (1912), et « cytosomes » ou « cytome » par Dangeard (1931). Sans entrer dans le détail de leur constitution, comme l'ont fait Mast, (S.O.) et Doyle (W.L.) (52) — (ces grains étant situés chez les amibes que nous avons obtenues juste à la limite de visibilité), nous pensons comme ces auteurs « qu'en raison même de la multiplicité des termes employés successivement pour désigner ces corps, il est évident qu'ils existe une incertitude assez grande à propos de leurs attributs ».

b) Les corps réfringents sont surtout nombreux en période de digestion active ; leur nombre diminue avec le jeûne. Mast (S.O.) qui les a observés minutieusement pense qu'il en existe de deux sortes : ceux qui sont inclus dans le cytoplasme même et que l'auteur désigne sous le nom de corps réfringents cytoplasmiques ou plus simplement « corps réfringents » et ceux qui se trouvent à l'intérieur des vacuoles ou « corps réfringents vacuolaires ».

La structure de ces corpuscules avait donné lieu cependant avant Mast, à de nombreuses confusions. Nombre d'auteurs avaient observé ces éléments sphériques et réfringents qui se coloraient fortement en rouge par le rouge neutre et chacun d'eux leur ayant donné un nom, la plus grande confusion en était résultée.

Mast, qui, comme nous l'avons dit, en a fait une étude détaillée, les appelle « corps sphériques réfringents ». Carter désigne ceux qui sont libres dans l'endoplasme sous le nom « d'ovules discoïdes ». Citons encore quelques noms donnés par d'autres auteurs : « corpuscules nucléés » (Wallich) ; « sphère nutritive », « globules oléagineux », « corps de Golgi » (Brown) ; « kystes » (Taylor), « corpuscules chromatiques », « Ergastome » (Dangeard).

Les corps réfringents vacuolaires ont reçu les noms de « Ballen und Kornerkonglomerate » (Wirenstein), « Réserverstoffe » (Heironymus), « mitochondries » (Horning), « sphérules métachromatiques » (Mast et Hahnert).

On peut comprendre aisément, en considérant la diversité de ces noms, que tous les auteurs n'étaient pas d'accord sur l'origine, la structure et la fonction de ces corpuscules : Wallich

et Calkins par exemple, les considèrent comme des corps reproducteurs ; pour Dangeard, ce sont des « corps deutoplasmiques ». Enfin, certains auteurs affirment qu'ils ont une structure homogène, alors que d'autres affirment le contraire.

« Toutes ces divergences d'opinions, pense Mast, viennent « surtout de la diversité des techniques cytologiques employées « par les différents auteurs ».

1° Les « corps réfringents » proprement dits, comme l'a montré cet auteur, sont constitués d'une partie externe assez fluide se colorant en rouge grenat par le rouge neutre et d'un globule intérieur, excentrique le plus souvent, qui ne se colore pas sous l'action du colorant. Il se colore très difficilement par l'acide osmique sur des individus fixés. On admet que ces corps sont identiques aux corpuscules de Golgi et que la partie centrale est constituée par un hydrate de carbone alors que la partie externe serait un stroma imprégné de matières grasses.

2° Les « corps réfringents vacuolaires » se colorent en grenat foncé par le rouge neutre et plus rapidement en noir par l'acide osmique. Ces deux propriétés indiqueraient qu'ils contiennent une substance qui, d'après Parat (1928), Hall (1929-30), Finley (1934), caractérise le vacuome.

c) CRISTAUX : On en rencontre également de deux sortes : les cristaux intraprotoplasmiques et les cristaux vacuolaires. Les premiers sont relativement peu nombreux par rapport aux seconds. Schaeffer en a rencontré de quatre formes différentes ; mais la plupart des auteurs, en particulier Mast, s'accordent pour affirmer qu'il n'en existe que de deux sortes : les cristaux aplatis et les cristaux bipyramidaux tronqués. Ces deux formes ont été décrites en détail par plusieurs investigateurs, qui ne sont d'ailleurs pas tous d'accord sur leur structure, leur constitution chimique et leur situation vis-à-vis des constituants cellulaires. Contrairement à ce qu'affirme Schaeffer, nous n'avons jamais rencontré une abondance de ces cristaux dans le protoplasme de *A. dubia*, la plupart de ceux que nous avons observés étant contenus dans les vacuoles. Les recherches minutieuses de Mast et Doyle (1935) ont permis à ces auteurs de conclure que les deux variétés de cristaux avaient une constitution chimique différente : les premiers (cristaux aplatis) étant, d'après eux, constitués uniquement par de la leucine, les autres, beaucoup plus complexes, seraient, d'après les mêmes auteurs, constitués par un composé de la glycine. Ce n'est d'ailleurs pas l'opinion de Luce (R.H.) et Pohl (A.W.) (1935) (48) qui pensent que tous les cristaux rencontrés chez les Amibes seraient du chlorophosphate de calcium.

d) Les corpuscules arrondis que nous avons également rencontrés dans le protoplasme des amibes, et qui sont différents des corps réfringents, seraient, pour la plupart des chercheurs, des globules graisseux existant seulement chez les amibes bien nourries : on constate, en effet, qu'avec le jeûne, ces globules diminuent de nombre et finissent même par disparaître. Leur constitution graisseuse serait prouvée par la coloration noire qu'ils prennent avec l'acide osmique et la coloration rouge avec le rouge Soudan III.

En comparant la description de *A. dubia*, donnée par Schaeffer avec la constitution morphologique de l'amibe que nous avons cultivée, nous voyons, qu'à quelques détails près (dimensions surtout), il y a identité presque complète entre les deux espèces.

PRÉLÈVEMENT DES AMIBES :

a) Milieux liquides : ce sont eux qui se prêtent le mieux à l'obtention des amibes. Une partie de la culture arrivée à son plein développement, est soumise à une centrifugation lente de quelques minutes. Le culot obtenu est lavé par deux fois avec de l'eau bidistillée à la température de 20 à 25°. Le centrifugal final contenant, à côté des amibes, la plupart des microorganismes du milieu est repris par quelques centimètres cubes d'eau bidistillée et laissé au repos pendant quelques heures, afin d'éliminer les effets de la centrifugation. Mast (S.O.) et Doyle (W.L.) ont en effet constaté que la centrifugation avait pour effet de répartir chez les amibes les constituants protoplasmiques en strates successives, en commençant par les parties les plus légères, l'ordre donné par les auteurs est le suivant :

— D'abord les globules graisseux qui se trouvent à la partie supérieure ; viennent ensuite les vacuoles à cristaux, une substance hyaline contenant de très petits cristaux, le noyau à côté duquel on trouve quelques vacuoles digestives et les granules B. Les vacuoles contenant de gros cristaux mélangés à de nombreux granules B et à des vacuoles digestives ; et enfin, en dernier lieu, les corps réfringents.

Les amibes centrifugées redeviennent rapidement normales, à la température du laboratoire. Le noyau d'après les auteurs cités ne recouvrerait que très lentement son aspect primitif, même à la température ambiante. Selon ces mêmes auteurs, la centrifugation aurait également pour effet de diminuer l'épaisseur et la viscosité de l'ectoplasme ou « plasmagel ».

Les amibes ainsi lavées et conservées dans de l'eau bidistillée ne peuvent guère, dans ces conditions, être conservées plus de 48 heures sans subir de changements dans leur aspect exté-

rieur ; au bout de ce temps, elles commencent en effet à s'arrondir et à s'enkyster, rendant ainsi le repiquage nécessaire.

b) Milieux solides : dans le cas où le prélèvement des amibes doit être fait sur milieux gélosés, il suffit de laver la surface d'une culture avec de l'eau bidistillée, de centrifuger et de soumettre le culot obtenu à un nouveau lavage, en prenant les mêmes précautions que précédemment.

CHAPITRE III

Fluorescence de la Quinine

§ I. — ETUDE MACROSCOPIQUE DU PHENOMENE

1° Généralités.

L'étude de la fluorescence de la quinine, phénomène observé par Herschell (1845) a excité la curiosité d'un grand nombre de chercheurs. Rabe et Marshall étudiant l'influence du solvant ainsi que celle de la concentration de l'acide, ne purent expliquer pourquoi le sulfate de quinine était plus fluorescent que le chlorhydrate.

Marke en étudiant la fluorescence des différents sels de quinine constata que la teinte de la fluorescence varie non seulement avec la nature de l'anion, mais aussi avec celle du solvant. Dans les liquides où l'ionisation ne peut se réaliser (benzène chloroforme), la fluorescence de la quinine à l'état de sel ou à l'état de base libre est perceptible.

D'après West. Meller Jette (101) l'augmentation de la fluorescence, dans le cas des solutions aqueuses n'est pas seulement due à l'augmentation du nombre d'ions libéré par la dissociation, puisque le même phénomène apparaît dans les solutions chloroformiques. En général, la dilution fait passer la teinte de fluorescence du vert au bleu. Cet auteur admet l'existence de deux formes différentes de quinine : l'une, à fluorescence violette, l'autre à fluorescence verte.

Pour nos expériences, nous nous sommes adressé au sulfate basique de quinine officinal, dont la solution aqueuse présente, comme on le sait, une belle fluorescence bleue. Cette fluorescence augmente d'ailleurs notablement sous l'influence des ions SO_4^{--} ; par contre, elle est inhibée par un certain nombre de substances.

VARIATIONS DE LA FLUORESCENCE DES SOLUTIONS AQUEUSES DE SULFATE DE QUININE : -

Pour faire l'étude des différents facteurs capables de faire varier la fluorescence du sulfate basique de quinine en solution

aqueuse, nous avons examiné toutes nos solutions en lumière ultra-violette, où la fluorescence, est comme on le sait depuis O. Oldenberg, considérablement augmentée.

D'autre part, avant d'entreprendre l'étude de la fluorescence du sel de quinine en solution sulfurique, il nous est normalement venu à l'esprit d'étudier, en fonction de la concentration des solutions d'alcaloïde, les variations de la fluorescence, en même temps que les variations de pH correspondantes. Pour la confection de nos solutions de quinine, nous avons utilisé le sulfate basique anhydre, la proportion d'eau dans le sel officinal étant inconstante.

Nous avons préparé une série de solutions dont la concentration est exprimée par un sous-multiple du poids moléculaire de l'alcaloïde :

$$\begin{array}{ccccc} M/5 \times 10^2 & M/10^3 & M/2 \times 10^3 & M/5 \times 10^3 & M/10^4 \\ & M/2 \times 10^4 & M/5 \times 10^4 & M/10^5, \text{ etc.} & \end{array}$$

Les pH de ces différentes solutions, mesurés en nous servant des colorants monochromes de Michaelis sont donnés par les valeurs suivantes :

TABLEAU I

CONCENTRATION MOLÉCULAIRE	pH	FLUORESCENCE
M/5.10. ²	5,8	Bleue violacée ★★★
M/10. ³	5,6	» » ★★★
M/2.10. ³	5,4	» » ★★★★★
M/5.10 ³	5,2	Bleu-franc ★★★★★
M/10. ⁴	5,1	» ★★★★★
M/2.10. ⁴	5,-	» ★★★
M/5.10. ⁴	5,-	» ★★★
M/10. ⁵	5,-	» ★★
M/2.10. ⁵	4,9	» ★★
M/5.10. ⁵	4,9	» ★★
M/10. ⁶	4,9	Bleue violacée ★
M/10. ⁷	4,9	Limite 0

Le tableau I rend compte également de la variation de la fluorescence dans les solutions de différentes concentrations envisagées.

Il aurait été intéressant d'évaluer avec précision dans chaque, l'intensité de la fluorescence par des déterminations photométriques, si nous avions pu disposer de l'appareil nécessaire à ces mesures.

La fluorescence observée pour les fortes concentrations est bleu-violacé et ne passe au bleu franc que pour les concentrations moyennes. Pour les très faibles concentrations, elle redevient violacée et nous verrons que les substances qui exercent une action inhibitrice sur la fluorescence de la quinine ont la même action que les très grandes dilutions.

West. Meller Jette (1928) (101) avait signalé ce phénomène et avait même conclu, nous l'avons vu, à l'existence de deux sortes de quinine possédant des fluorescences de teintes différentes.

Quoi qu'il en soit, la considération du tableau précédent nous permet de voir que le maximum de fluorescence se trouve dans les concentrations comprises entre (M/2.000 - M/5.000)

2° Influence du pH.

Etant donné que les solutions sulfuriques de sulfate de quinine sont plus fluorescentes que les solutions obtenues sans addition d'acide, nous avons pensé à suivre d'une façon méthodique les variations de la fluorescence d'une même concentration de l'alcaloïde en fonction du pH.

Colombier (L.) (14) en 1931, étudiant entre autres corps les variations de la fluorescence des solutions de quinine en fonction du pH utilisé pour leur ajustement, les solutions tampon de Sorënsen ; il trouve que la quinine a son maximum de fluorescence à $\text{pH} = 5$, cette fluorescence décroissant lentement jusqu'à extinction complète à $\text{pH} = 9,0$. Or, dans cet intervalle de pH, quatre sels différents sont utilisés pour la préparation des solutions-tampon :

- De 5 à 5,8: Phtalate acide de potassium N/5.
- De 5,8 à 7,9: Phosphate acide de potassium N/5.
- De 7,8 à 9 : Un mélange de : Acide borique N/5,
Chlorure de Potassium N/5.

Dès lors, on peut se demander si les variations de la fluorescence sont exclusivement dues aux variations de pH, et, si les différentes substances employées dans les solutions tampon, surtout le chlorure de potassium, n'ont pas une action propre sur la fluorescence de la quinine. Nous verrons un peu plus loin en effet l'action inhibitrice que peut exercer un chlorure alcalin, le chlorure de sodium en particulier, sur la fluorescence du sulfate de quinine. Afin d'obvier à cet inconvénient, nous avons employé, pour réaliser les différents pH étudiés : de l'acide sulfurique N/50 pour les zones acides et de la soude N/50 pour les zones alcalines.

Pour étudier les variations de la fluorescence en fonction du pH, nous avons utilisé deux concentrations différentes de sulfate de quinine : $N/10^4$ et $N/2.10^4$. L'ajustement des solutions aux différents pH a été fait par la méthode colorimétrique en employant, comme précédemment, les colorants monochromes de Michaelis. Dans les deux cas, les variations de la fluorescence ont été identiques. Voici environ l'allure du phénomène :

De pH : 4,9 (pH initial des solutions utilisées) jusqu'à pH : 3,2, la fluorescence augmente régulièrement et rapidement d'intensité et passe du bleu violacé au bleu lumineux intense.

De pH : 3,2 à pH : 2,8 elle se maintient à peu près constante.

En dessous de pH : 2,8, elle diminue très lentement et passe du bleu intense au bleu légèrement violacé.

Dans la zone alcaline (ajustement avec la soude $N/50$) la fluorescence diminue d'une façon progressive en devenant de plus en plus violacée, depuis pH : 4,9 jusqu'à pH : 7 à 7,4, où elle est limite.

En étudiant en fonction de la concentration, les variations de la fluorescence de solutions de Sulfate de Quinine ajustées toutes au pH : 3,2, correspondant au maximum de fluorescence, nous avons observé que :

De $M/5.10^2$ à $M/5.10^3$ ou $M/10^4$, la fluorescence croît rapidement en intensité et présente son maximum pour les deux dernières concentrations citées.

De $M/10^4$ à $M/10^7$, l'intensité décroît régulièrement, mais la fluorescence ne passe au bleu violacé que dans les dernières dilutions.

INFLUENCE DES SULFATES ALCALINS SUR LA FLUORESCENCE DU SULFATE DE QUININE :

Si l'augmentation de la fluorescence des solutions de quinine sous l'action de l'acide sulfurique est due à l'apport des ions SO_4^4 , nous devons observer le même phénomène si cet apport est fait sous forme de sulfate alcalin, par exemple.

Or, on constate en effet que le sulfate de sodium ou le sulfate de potassium introduits dans une solution de sulfate basique de quinine augmentent nettement la fluorescence de celle-ci. Cependant, l'augmentation de la fluorescence n'est pas proportionnelle à la quantité de sulfate alcalin introduite. En augmentant de plus en plus la concentration d'une même solution de quinine, en sulfate de sodium par exemple, on observe que :

De 0 à 2% en sulfate de sodium, la fluorescence augmente notablement ;

De 2 à 5% la fluorescence ne change presque pas, ayant atteint son maximum ;

De 5 à 10% la fluorescence baisse légèrement.

En étudiant l'action des différents sulfates alcalins sur la fluorescence des solutions de sulfate de quinine, nous avons observé qu'à l'exclusion du sulfate d'ammonium, dont l'action était nettement plus intense, les sulfates de sodium et de potassium ont à peu près la même action. Cette influence nettement supérieure du Sulfate d'ammonium n'est cependant pas due à l'ion NH_4^+ , puisque l'ammoniaque inhibe au contraire la fluorescence de la quinine.

L'augmentation de l'intensité de fluorescence du sulfate basique de quinine sous l'action de l'acide sulfurique est due «au passage du sel sous forme de sulfate neutre plus fluorescent» (Codex). Cependant la transformation complète du sulfate basique en sulfate neutre ne correspond pas au maximum de fluorescence; en effet, on observe que la fluorescence d'une solution relativement concentrée de sulfate neutre de quinine donne, par addition d'acide sulfurique, une fluorescence nettement plus intense. D'ailleurs, si à une solution de sulfate neutre de quinine de concentration déterminée on ajoute de l'acide sulfurique dilué, jusqu'à l'obtention d'un pH : 3,2 et que l'on compare la fluorescence donnée par une telle solution avec celle d'une solution de sulfate basique amenée au même pH par l'acide sulfurique, on constate l'égalité des deux fluorescences. On peut donc en conclure que le sulfate neutre n'est qu'une étape dans le passage du sulfate basique sous sa forme la plus fluorescente.

4° Action de l'Ion Chlore :

Si l'ion SO_4^{4-} a une action favorisante sur la fluorescence du sulfate basique de quinine, l'ion chlore, au contraire, exerce sur celle-ci une action inhibitrice. Ce n'est cependant pas l'avis de Rabe et Marschall « on n'a pas expliqué, disent ces auteurs, pourquoi le sulfate est plus fluorescent que le chlorhydrate ; ce n'est pas l'ion chlore qui est inhibiteur puisque le trichloracétate est plus fluorescent que l'acétate ». Or, en étudiant d'une façon rationnelle l'action des doses croissantes de chlorure de sodium sur la fluorescence du sulfate basique de quinine, nous avons confirmé cette action inhibitrice. D'ailleurs, en utilisant du chlorure de potassium à la place du chlorure de sodium, on obtient des

résultats à peu près identiques. C'est donc bien l'ion chlore qui est inhibiteur. En augmentant d'une façon progressive la concentration d'une solution M/10⁵ de sulfate de quinine à pH : 3,2 en chlorure de sodium, on constate le phénomène suivant (Tableau II) :

TABLEAU II

CINa ‰	FLUORESCENCE
0	Belle fluorescence bleue ...★★★★
0,10	Fluorescence peu influencée.★★★★
0,20	» un peu diminuée ... ★★★
0,50	» diminuée nettement.★★
1	» très diminuée★★
5	» violacée★
9	» » presque nulle

L'intensité de la fluorescence diminuée par le chlorure de sodium peut augmenter sous l'action de l'acide sulfurique en excès. Ainsi, à 10 cc. d'une solution de concentration M/10⁵ et de pH = 3,2 et contenant 1./1.000 de chlorure de sodium, il faut ajouter 15 gouttes d'acide sulfurique pur pour obtenir une fluorescence égale à celle de la solution primitive (M/10⁵ de pH = 3,2). La fluorescence baisse encore plus rapidement quand le sulfate de quinine n'est pas en solution sulfurique.

ACTION DES HÉMATIES :

Nous avons vu que, mises en suspension dans une solution de sulfate de quinine, les hématies fixent l'alcaloïde : R. Fabre (19) et Fourment et Hermann (24).

Cette disparition d'une partie de la quinine du milieu ambiant baignant les hématies, doit normalement se traduire par une baisse de l'intensité de fluorescence du milieu quand on l'expose aux radiations ultra-violettes.

Réalisant, en sens inverse, les expériences de Hermann et Fourment, nous avons suivi la diminution progressive de la fluorescence d'une solution de sulfate de quinine de pH : 3,2, sous l'influence d'un contact de plus en plus prolongé avec des hématies de chien. Auparavant, et pour éviter l'action défavorable du chlorure de sodium normalement présent dans les globules, nous avons soumis les hématies à plusieurs lavages avec une solution de sulfate de sodium isotonique.

Au bout de 4 à 5 lavages (avant chaque centrifugation, nous

laissons en contact 5 à 10 minutes) l'élimination des chlorures est à peu près totale : le dosage des chlorures effectué sur la purée globulaire obtenue par centrifugation donne un chiffre très faible, de l'ordre des causes d'erreurs. Nous avons mis en suspension une dernière fois les hématies dans une solution de sulfate de sodium isotonique de façon à réaliser une dilution du sang au 1/10. D'autre part, pour montrer le phénomène avec son maximum d'intensité, nous avons opéré avec une solution de sulfate de quinine M/2.10⁴ à pH = 3,2, correspondant au maximum de fluorescence.

Les premières expériences que nous avons effectuées étant réalisées avec la même concentration de quinine, mais non isotonique, les hématies étaient hémolysées et l'allure du phénomène était la suivante (Tableau III) :

TABLEAU III

Volume de solutions de Sulfate de Quinine (non isotonique)	Volume de suspension d'hématies au 1/20	Volume d'eau ajouté	FLUO- RESCENCE
10 cc.	0	3 cc.	★★★★
10 cc.	1	2 cc.	★★★
10 cc.	2	1 cc.	★★
10 cc.	3	0 cc.	★

Ces résultats ne nous rendaient pas compte du pouvoir de fixation des hématies vis-à-vis de l'alcaloïde, la baisse rapide de fluorescence étant probablement due à la quantité plus ou moins grande d'hémoglobine présente dans les solutions obtenues et soumises ultérieurement aux radiations ; la coloration des solutions causée par l'hémolyse des hématies allant du rose pâle au rose franc.

Pour éviter ceci, et pour essayer de connaître l'action apportée par l'hémolyse, nous avons alors utilisé la même concentration de quinine M/2.10⁴, mais en solution isotonique avec du sulfate de sodium. Nous nous étions assuré auparavant que le dernier liquide de lavage des hématies était absolument incolore.

Nous avons mis en contact un volume constant (2 cc.) de la suspension d'hématies en contact avec 10 cc. de la solution isotonique de quinine envisagée ; pendant des temps plus ou moins longs, et en agitant. Au bout de ces différents temps, on

centrifuge avec précaution et l'on compare le liquide surnageant avec la solution de quinine témoin ($M/2.10^4$) et de $pH = 3,2$, dans laquelle on a remplacé la suspension d'hématies par un volume égal de la solution isotonique de sulfate de sodium.

TABLEAU IV

TEMPS DE CONTACT en minutes	FLUORESCENCE
5	Peu influencée★★★★★
10	»★★★★★
20	»★★★★★
30	Diminuée légèrement★★★★
60	Très diminuée★★★
120	»★★
240	Considérablement diminuée★

Les liquides de centrifugation de ces différentes expériences ne présentaient qu'une hémolyse extrêmement faible ou pas d'hémolyse du tout.

Cette diminution de fluorescence ne peut donc provenir que de la fixation croissante de l'alcaloïde par les hématies.

ACTION DU SÉRUM SANGUIN :

Nous avons voulu également voir, à côté de cette action spécifique des hématies, l'action du sérum sanguin sur la fluorescence que présente le sulfate de quinine en solution sulfurique.

Nous avons utilisé pour cela du sérum humain, prélevé depuis 12 heures au maximum ; la concentration et le pH de la solution de quinine employée étant les mêmes que précédemment ($M/2.10^4$) ($pH : 3,2$).

TABLEAU V

CONCENTRATION en sérum sanguin	FLUORESCENCE
1/10.000	Peu influencée★★★★★
1/1.000	»★★★★
1/500	Diminuée★★★
1/200	»★★
1/100	»★
1/50	»0

L'addition de 1/200 de sérum ne produit aucune modification visible dans la solution de quinine utilisée ; à la concen-

tration 1/100, par contre, il y a une légère précipitation, le liquide obtenu est opalescent.

La quantité de chlorure normalement présente dans le sérum ne peut être rendue uniquement responsable de cette action inhibitrice. En effet, nous avons vu qu'à une concentration en sérum de 1/100, la fluorescence était très abaissée ; or, le sérum employé contenait une dose de chlorure de 4 gr. à 4 gr. 50 par litre, ce qui correspondrait à une concentration finale en chlorure de sodium comprise entre 1/23.000 et 1/25.000 environ, concentration bien trop faible pour exercer une action inhibitrice nette. Il semble paraître que cette action serait due à la fixation de la quinine par les substances colloïdales du sérum.

§ II. — MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

L'étude des phénomènes de fluorescence provoque de plus en plus l'intérêt scientifique et nombreuses sont déjà les applications pratiques qui en découlent dans le domaine de la recherche de laboratoires et de la technique industrielle.

La présence de substances fluorescentes au sein des tissus animaux ou végétaux, a conduit les chercheurs à essayer de localiser directement ces substances en se servant d'un dispositif microscopique convenable, comprenant, d'une part, une source lumineuse riche en radiations ultra-violettes et, d'autre part, un microscope pourvu d'un système optique (miroir et condenseur) perméable à ces radiations. Le choix de la source lumineuse devait en particulier retenir l'attention des chercheurs étant donné que, comme le fait remarquer R. Fabre, les « fluorescences observées parfois sont très faibles et ne peuvent être étudiées avec exactitude que si la puissance de la source est aussi considérable que possible. »

L'appareil de Reichert nous a permis de réaliser toutes nos expériences. Dans ce dispositif, la lumière ultra-violette très intense est fournie par un arc électrique jaillissant entre une électrode de fer et une électrode de charbon à l'intérieur d'une boîte métallique close. Le lumière ainsi produite condensée par un miroir concave (4) et une série de lentilles formant collecteur (23) passe à travers deux filtres (19 et 20) comprenant une cuve à faces parallèles contenant une solution de sulfate de cuivre à 20% et un verre à l'oxyde de nickel (19). Le faisceau de rayons filtrés ne comprenant que les radiations comprises

entre 3.000 et 4.000 Å. tombe sur le miroir du microscope (14) qui réfléchit les rayons ultra-violets à travers le condensateur (15) sur la face inférieure de la préparation. Miroir, condensateur et lame porte-objets sont constitués d'un verre spécial perméable aux radiations ultra-violettes.

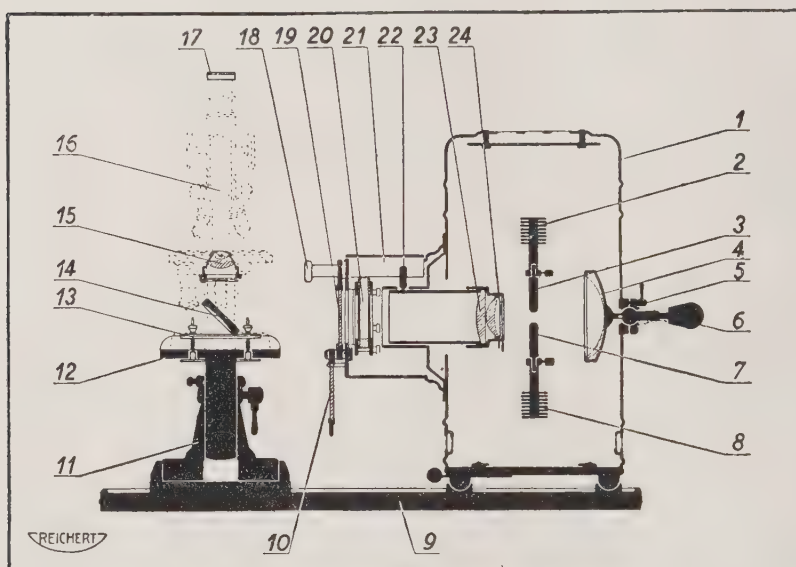


Fig. 1. — Schéma de l'installation complète pour la microscopie de fluorescence.

- | | | |
|---|--------------------------------------|---|
| 1 Enveloppe | 9 Plaque de base | 17 Filtre d'exclusion sur l'oculaire |
| 2 Support cannelé supérieur d'électrode | 10 Ecran opalin | 18 Support pour les miroirs périscopiques |
| 3 Electrode supérieur | 11 Socle pour le microscope | 19 Verre fumé |
| 4 Réflecteur | 12 Plaque de base pour le microscope | 20 Cuve à filtre |
| 5 Articulation rotatoire | 13 Dispositif de serrage | 21 Tube d'éclairage |
| 6 Manche | 14 Miroir du microscope | 22 Monture hélicoïdale du collecteur |
| 7 Electrode inférieur | 15 Condensateur à fond noir-clair | 23 Collecteur |
| 8 Support cannelé inférieur d'électrode | 16 Microscope | 24 Verre protecteur |

La lumière de fluorescence émise par la préparation après avoir traversé le système optique du microscope (objectif et oculaire de modèle habituel) est privée des rayons ultra-violets par un filtre d'exclusion en verre jaune placé sur l'oculaire.

Malgré toutes les précautions prises pour que la lumière arrivant à l'œil de l'observateur soit aussi débarrassée que possible de rayons nocifs, on doit éviter de faire des observations de longue durée (au-delà de 30 à 45 minutes). D'autre part, au bout d'un certain temps de fonctionnement, une chaleur exces-

sive se dégage de l'appareil et l'observation ne peut plus se poursuivre dans de bonnes conditions.

MICROPHOTOGRAPHIE :

Le dispositif microscopique utilisé permet également de faire des microphotographies, en plaçant sur l'oculaire du microscope une chambre microphotographique. Toutefois, s'il est relativement facile d'obtenir des images nettes de préparations fluorescentes inanimées (coupe histologique), il est plus délicat de photographier des microorganismes vivants, ce qui rend à peu près obligatoires les temps de pause très courts.

Nous verrons plus loin d'ailleurs, que lorsqu'une amibe est immobilisée par suite de l'action simultanée de fortes concentrations de quinine et de l'irradiation ultra-violette, les mouvements protoplasmiques existent néanmoins, causant le déplacement des vacuoles florescentes et des granulations lumineuses dans toutes les parties de la cellule, et l'image obtenue après une exposition relativement longue de la plaque sensible ne présente aucune netteté.

Enfin, lorsque l'amibe est soumise à l'action d'une concentration d'alcaloïde suffisante pour l'immobiliser complètement, son protoplasme, nous le verrons également plus loin, subit une contraction assez prononcée et l'on ne peut plus distinguer nettement l'organisation cellulaire, ni la photographier. Nous devons souligner toutefois que, si l'observation des êtres microscopiques vivants en lumière ultra-violette constitue une méthode précieuse d'investigations, elle ne met pas le chercheur à l'abri d'une cause d'erreur provenant de l'action propre des ultra-violets sur le protoplasme vivant, action qui a été bien étudiée par différents auteurs (Biancani (E.H.) (4) et Heilbrun (L.V.) et K. Daugherty (28). Cependant, nous avons eu l'occasion d'observer que, surtout après interposition du filtre à l'oxyde de nickel, la quantité de lumière ultra-violette qui arrive au contact de la préparation n'exerce pratiquement pas d'action toxique sur les amibes ; au contraire, cette faible dose de rayons U.V. a plutôt sur elles un effet stimulant (fluidité augmentée et rapidité plus grande de progression) comme l'avait constaté Heilbrun (L.V.) et K. Daugherty en 1933, qui comparent cet effet à celui obtenu par un courant électrique. Par contre, si on irradie la préparation après avoir enlevé les différents organes filtrants (cuve à sulfate de cuivre, plaques de verre dépoli et à l'oxyde de nickel) donc avec de fortes doses de rayons U.V., on observe sur les protozoaires en

expérience les effets décrits par les auteurs cités plus haut, en particulier un arrêt des mouvements trabéculaires et une augmentation de la fluidité précédant une contraction nette, une coagulation du protoplasme.

Nous insisterons sur ce fait que, dans les conditions de nos expériences, les amibes n'ont été soumises qu'à une irradiation modérée par les rayons U.V.

CHAPITRE IV

Résultats généraux concernant l'action de la quinine sur les amibes

§ I. — DETERMINATION DE LA MORT D'UNE AMIBE. — INTOXICATION

L'étude de la toxicité des substances destinées à l'emploi thérapeutique, doit être entreprise en expérimentant sur des animaux, se rapprochant par leur constitution anatomique, le plus possible de l'homme.

C'est donc à des mammifères que l'on s'adresse la plupart du temps, et la seule raison d'économie conduit à utiliser des animaux de petites tailles : souris, rats, cobayes ou lapins.

On détermine alors, par des expériences répétées sur un assez grand nombre d'entre eux, la dose de produit, qui, introduite dans l'organisme par une voie déterminée, provoque la mort au bout d'un certain temps. Le terme de l'expérience — la mort du sujet — peut être aisément décelé en notant le moment exact où survient l'arrêt des battements cardiaques.

Il en est tout autrement si l'on étudie la toxicité d'une substance sur des organismes peu différenciés et moins élevés dans l'échelle animale : nous voulons parler en particulier des protozoaires.

Dans le cas des infusoires, on a toujours admis que la mort d'un individu était caractérisée par la cessation totale des mouvements ciliaires (ceux de la partie postérieure étant les derniers à s'arrêter). En ce qui concerne les amibes, l'arrêt total de la formation de pseudopodes a parfois été considéré comme le signe le plus net de la mort de ces protozoaires. En vérité, nous

avons trouvé dans la littérature peu de détails et de précisions concernant la détermination du moment précis où la mort se produit. On sait cependant que certains poisons (anesthésiques) peuvent faire cesser chez les amibes la formation de pseudopodes d'une façon temporaire si la dose de substance est assez faible. On a donc été conduit à se fonder sur un autre critérium.

Un grand nombre de chercheurs ont utilisé la méthode de réensemencement en admettant que l'absence de développement d'une culture était la conséquence de la mort des individus constituant le lot ensemencé. Toutefois, l'étude de l'action des antiseptiques sur les bactéries a montré que le nombre des individus tués dans une culture ayant subi l'action de la substance chimique est toujours plus faible que le nombre des bactéries capables de se reproduire ; il y a donc lieu de distinguer l'action « antibiotique » que l'on peut assimiler à l'action toxique, et l'action « antigénétique » d'une substance déterminée.

Lorsqu'on examine une amibe soumise à l'action d'un toxique, on constate que, longtemps après la disparition complète des pseudopodes, il se manifeste à l'intérieur même du protozoaire des mouvements protoplasmiques, dont l'amplitude et la fréquence diminuent au fur et à mesure que l'intoxication progresse. Selon le poison utilisé, on observe un peu avant la mort de l'amibe :

— Soit une immobilisation complète de l'amibe avec une forte contraction du protoplasme ;

— Soit une rupture de la couche limitante, suivie, dans certains cas, de l'irruption du milieu ambiant à l'intérieur de la cellule (inrush), et, dans d'autres, de l'expulsion d'une partie du protoplasme : ces derniers phénomènes, qui sont des transformations traumatiques de la cellule, sont suivis au bout de peu de temps d'une immobilité complète, la désagrégation cellulaire n'intervenant qu'ensuite.

Il est évidemment logique d'admettre que, parvenue à cette phase d'immobilité absolue, l'amibe a cessé de vivre ; d'ailleurs, la désagrégation cellulaire qui succède à ce stade est une preuve suffisante de la mort du protozoaire. Il est inexact cependant de prétendre qu'il y a toujours à la mort une immobilité complète du protoplasme. Assez fréquemment, on observe en effet, aussitôt après la mort de la cellule une fluidification de la matière protoplasmique donnant naissance à un mouvement particulier de trépidation plus ou moins intense des différentes granulations et inclusions cellulaires. Or, ce mouvement se produisant d'une façon continue et progressive, la question se posait, à savoir si

ce phénomène était une manifestation de la vie, ou s'il était simplement lié à une modification physique de la structure du protoplasme mort.

Nos expériences nous ont permis de voir que ce phénomène prend naissance après que l'amibe a cessé de vivre, persistant, dans certains cas, pendant un temps assez long.

Il se produit cependant au moment de la mort du protozoaire certaines modifications morphologiques que le microscope permet de déceler sans aucun artifice. Telle est, en particulier, la transformation que subit le noyau. Ce phénomène, qui a été mis en évidence par certains auteurs, consiste surtout en un changement d'aspect de la substance nucléaire perceptible surtout à l'ultramicroscope. Nous avons comparé les données fournies par l'examen microscopique pratiqué avec l'éclairage à fond noir, avec les résultats obtenus par la méthode des réensemencements, et, d'autre part, nous avons cherché à voir si le critère de la transformation nucléaire coïncidait avec l'arrêt total des mouvements intraprotoplasmiques, à l'exclusion du mouvement de trépidation observé.

Nous avons procédé pour ces trois déterminations à l'intoxication des amibes au moyen d'une solution de sulfate de quinine M/5.10³ de pH égal à 3,2, qui provoque la mort des amibes en une demi-heure environ.

1° Détermination à l'Ultramicroscope :

Lorsqu'on examine une amibe vivante à l'ultramicroscope, on constate que le noyau se différencie nettement des autres inclusions de même taille, en particulier des corps réfringents protoplasmiques ; en lumière légèrement atténuée, il se présente sous la forme d'un disque central sombre, dont la périphérie, légèrement éclairée (pénombre), est cerclée d'un anneau très sombre, qu'entoure enfin une zone mince très éclairée. On a d'ailleurs parfois de la peine à découvrir ce noyau, car il est sans cesse déplacé avec les autres inclusions par les mouvements protoplasmiques ; il disparaît pendant un certain temps, puis reparait dans le plan sur lequel le microscope a été mis au point ; chez une amibe en déplacement, le laps de temps qui sépare deux apparitions consécutives du noyau est à peu près constant ; il correspond sensiblement à la durée d'une révolution de la masse protoplasmique dans le sens de la progression.

Chez une amibe intoxiquée et immobilisée, la circulation du

protoplasme étant le plus souvent localisée, avec des mouvements de petite amplitude, les temps d'apparition et de disparition du noyau sont beaucoup plus longs. Au moment où l'amibe meurt, le noyau change assez brusquement d'aspect dans sa partie la plus interne : le disque central devient plus lumineux, surtout sur les bords ; l'anneau noir qui entourait ce disque devient moins opaque et s'éclaircit même notablement ; enfin, la zone externe lumineuse présente peu de modifications.

2° Détermination par la Méthode de Réensemencements :

Un certain nombre d'amibes étant soumises à l'action d'une solution de sulfate de quinine ($M/5.10^3$) on dispose dans une série de tubes à hémolyse une certaine quantité de milieu de culture à 24°C environ et de $\text{pH} = 7,2$. On prélève alors, toutes les cinq minutes, une certaine quantité d'amibes intoxiquées que l'on lave à l'eau distillée par centrifugations en laissant en contact de dix à quinze minutes chaque fois, afin de permettre l'élimination de la plus grande quantité possible de l'alcaloïde. On porte ensuite ces amibes dans les dix tubes correspondant à un temps d'intoxication de cinquante à soixante minutes, au maximum, est mise à l'étuve à 22° pendant 24 heures. On examine au bout de ce temps le contenu de ces différents tubes et on note le premier tube où l'on obtient une culture.

3° Détermination par l'observation directe au Microscope en lumière normale :

Nous avons vu que, chez une amibe normale en déplacement, il y avait une circulation continue de la matière protoplasmique d'arrière en avant et d'avant en arrière. Chez une amibe soumise à l'action d'un toxique, les mouvements, nous l'avons dit, diminuent peu à peu d'intensité et se localisent, les coulées trabéculaires s'arrêtent et reparaissent après des intervalles de plus en plus longs ; enfin, il arrive un moment où le cytoplasme ne présente plus aucun mouvement d'ensemble même localisé, si ce n'est dans certains cas le mouvement de trépidation dont nous avons déjà parlé.

C'est à l'arrêt de toute cette activité interne, de ces déplacements localisés du protoplasme que correspond la mort de l'amibe, mort précédée quelquefois de brusques sursauts du contenu cellulaire. Les résultats obtenus par ces trois méthodes sont les suivants :

1° Les observations ultramicroscopiques ont permis de voir

que la transformation nucléaire se produit entre 22 et 26 minutes ;

2° Par la méthode des réensemencements, on constate que dans le contenu du tube N° 3, correspondant au prélèvement fait au bout de 15 minutes, la presque totalité des amibes sont vivantes et émettent des pseudopodes. Il en est évidemment de même dans les tubes N° 1 et 2.

Dans le tube N° 4 (prélèvement fait au bout de 20 minutes) 40 à 50% des amibes sont mortes ; les autres, émettent encore des pseudopodes, mais sont cependant moins vigoureuses que celles des tubes précédents.

Dans le tube N° 5, (prélèvement fait au bout de 25 minutes), 75 à 80% d'amibes sont mortes.

Enfin, dans le tube N° 6 (30 minutes) il ne subsiste presque plus de spécimens vivants.

Or, si l'on considère le temps au bout duquel la solution de quinine étudiée produit un effet submaximal, on peut dire que l'effet toxique de cette substance se manifeste après 25 minutes de contact avec les organismes considérés.

Enfin, l'observation microscopique a montré que la cessation de tout mouvement protoplasmique local chez le même pourcentage d'amibes se produit au bout de 23 à 25 minutes. En reprenant ces expériences avec une concentration M/10.⁴ et à pH : 3,2, nous avons trouvé les chiffres suivants :

1° Observation du noyau à l'ultramicroscope : 44 à 50 minutes ;

2° Méthode des réensemencements : 45 minutes ;

3° Observation des mouvements protoplasmiques : 45/48 minutes.

La détermination par trois méthodes différentes du temps au bout duquel survient la mort d'une amibe aboutit à des chiffres très voisins. Nous remarquerons toutefois que la méthode des réensemencements nous a donné des chiffres légèrement inférieurs aux deux autres méthodes. On peut très simplement expliquer ce phénomène, si l'on admet que la toxicité d'une solution se manifeste sur le pouvoir de multiplication des protozaires avant de s'en prendre à leur vitalité. C'est là, nous l'avons vu, ce qui a permis de distinguer les pouvoirs antibiotiques et antigénétiques d'une substance antiseptique.

Devant la possibilité où nous nous trouvons dès lors de déterminer par l'examen microscopique le moment exact où une amibe vient à mourir, nous pouvons aborder l'étude de la toxicité et des modalités de l'action physiologique de la quinine

sur l'organisme en question. Les différentes recherches auxquelles a donné lieu l'étude de l'action des substances chimiques sur les substances végétales et animales ont été réalisées pour la plupart en employant la méthode de l'immersion, où, les cellules, plongées dans une solution de la substance à essayer, sont observées directement au microscope. Il est possible d'obtenir par cette méthode des renseignements concernant la plus ou moins grande toxicité de la substance dissoute, mais on ne peut tirer de là que peu d'indications, concernant les modalités de l'action physiologique.

Trois hypothèses peuvent être émises à ce sujet :

1° Le toxique se localise et agit exclusivement à la surface de la cellule (Chambers et Reznikoff (P.) (75) - Brinley (F.P.) 1928 (8).

2° La substance chimique traverse la couche limitante cellulaire et l'action toxique est liée à la pénétration de cette substance dans le cytoplasme. Les expériences de micromanipulation ont fourni à ce sujet d'intéressants renseignements.

3° L'action toxique se manifeste à la fois à la surface cellulaire et au sein du cytoplasme.

Certains auteurs en effet (Brinley F.J. 1929 - Yun-Chi-Morita et R. Chambers (1929) (103) et d'autres) par des microinjections pratiquées en des points localisés de la cellule au moyen de pipettes extrêmement fines, ont pu mettre la substance chimique directement en contact avec le cytoplasme ; ils sont arrivés dans certains cas à cette conclusion que de nombreuses substances n'exercent leur action toxique que sur la couche cellulaire externe.

Les expériences de Hiller (1927) (30) sur les narcotiques et de Brinley (1928) (8) sur l'acide cyanhydrique ont montré en effet que ces corps n'exercent pas d'effet toxique chez les amibes si on les injecte directement dans le protoplasme. Bien que cette question n'ait pu être tranchée, aussi nettement dans tous les cas, on doit admettre que la couche limitante cellulaire joue un rôle prépondérant dans le comportement d'un protozoaire vis-à-vis des substances chimiques en contact desquelles il se trouve.

A l'encontre des résultats que nous venons d'exposer, Harvey (1911) et Jacobs 1929) étudiant la rapidité de pénétration de certaines substances à l'intérieur des amibes ont admis que la toxicité de ces substances était liée au degré de pénétration.

MATÉRIEL ET MÉTHODES :

Pour vérifier une telle hypothèse, nous avons pensé tirer parti

de l'emploi de substances dont la pénétration dans la cellule pourrait être directement mise en évidence ; c'est ce qui nous a amené à utiliser la fluorescence donnée par le sulfate de quinine.

La technique que nous avons utilisée se rapproche beaucoup de celle qu'avait employée en 1928 Brinley (F.J.) pour étudier l'action coagulante ou liquéfiante des substances chimiques sur le cytoplasme amibien, le sens et l'intensité de cette action étant appréciée d'après la vitesse du mouvement brownien des micro-particules (granulations A. et B. de Mast (S.O.) et Doyle (W.L.) (52). Pour réaliser ses expériences, l'auteur opère de la façon suivante : une goutte de la culture contenant les amibes est déposée sur une lame et recouverte d'un couvre-objet, maintenu à un écartement suffisant au moyen de petits morceaux de lamelle ; on dépose alors près du bord de la lamelle une goutte d'une solution de la substance à essayer qui diffuse peu à peu au contact des amibes.

Cette façon de procéder présente un inconvénient : c'est que la solution dans laquelle se trouvent les amibes n'a pas que la solution dans laquelle se trouvent les amibes n'est pas une composition homogène. L'auteur dit simplement que les concentrations des solutions qui arrivent au contact des amibes sont un peu inférieures aux concentrations théoriques.

Nos essais devant être pratiqués au moyen de solutions de concentrations bien déterminées, nous avons dû employer une méthode un peu différente :

Les amibes employées pour ces expériences sont préalablement lavées avec de l'eau bidistillée à 22/24° C par trois centrifugations successives à faible vitesse, de façon à réduire au minimum les effets de la centrifugation, effets décrits par Mast et Doyle et dont nous avons déjà parlé, dans le Chapitre II ; les amibes sont mises finalement en suspension dans de l'eau bidistillée en quantité telle, qu'une goutte de la suspension examinée entre lame et lamelle présente environ de 1 à 3 amibes par champ à faible grossissement (objectif N° 3).

Pour réaliser l'immersion complète des amibes dans les solutions toxiques, on dépose sur une lame, au moyen d'un fer à luter, deux minces trainées de paraffine parallèles et distantes de 2 centimètres à 2 centimètres 1/2 environ. Les différentes concentrations des solutions toxiques à étudier sont réalisées de la façon suivante : Sur une lame mince préparée comme ci-dessus, on dépose entre les trainées de paraffine une goutte de la suspension d'amibes, puis, avec une pipette de même calibre que la précédente, on ajoute une goutte d'une solution de qui-

nine, de concentration double de celle que l'on veut finalement obtenir ; on mélange soigneusement et on recouvre de la lamelle ; on lute alors les bords droit et gauche de celle-ci. Cependant, pour les observations de courte durée, cette précaution, qui a pour but d'éviter les déplacements de la lamelle, n'est pas indispensable, mais elle devient nécessaire pour l'observation au moyen de l'objectif à immersion.

Bien que cette technique nous ait donné des résultats satisfaisants, nous avons préféré par la suite opérer de la manière suivante :

Dans une série de petits tubes à hémolyse, on met 0 cm³ 3 de la suspension d'amibes, puis on ajoute un volume égal d'une solution alcaloïdique de concentration double et de pH : 3,2 ; on agite soigneusement afin d'obtenir un mélange homogène des deux liquides. On prélève alors deux gouttes de ce mélange, que l'on examine entre lame et lamelle, toutes les dix minutes environ, pour les observations dont la durée est inférieure à 45 minutes, et tous les quarts d'heure pour les observations de plus longue durée.

On prend comme temps d'intoxication celui au bout duquel, sur la lame examinée, les amibes mortes sont dans la proportion de 15 à 18 pour 20 spécimens observés (80/90 %). Pour chaque concentration, nous avons fait cinq à six déterminations.

Il est indispensable, pour toutes ces expériences d'intoxication, d'employer des amibes présentant le même comportement physiologique. Lavées et mises en suspension dans de l'eau bidistillée, elles peuvent vivre en général un temps relativement long, mais ne conservent pas longtemps leur forme active particulière (forme et rapidité de déplacement des pseudopodes). Même maintenues à l'étuve à 22 à 24° C, elles s'arrondissent et commencent à s'enkyster au bout de 24 à 36 heures environ. Afin de les conserver, avec leur forme de progression, un peu plus longtemps, il faut les mettre en suspension dans de l'eau bidistillée sous faible épaisseur ; mais dans ce cas, on réalise une large surface de contact avec l'air qui favorise l'évaporation. Les amibes ainsi conservées en suspension dans de l'eau bidistillée depuis un temps relativement long, voient leur résistance à l'action toxique de la quinine diminuer notablement. Dans le même ordre d'idées, nous avons constaté que plusieurs autres facteurs peuvent exercer également une certaine influence sur leur résistance à l'intoxication :

1° *Nature du milieu de culture* : Les amibes obtenues sur les milieux gélosés sont un peu plus sensibles à l'action de la

quinine que celles qui se sont développées en milieux liquides (blé).

2° *Age de la culture* : Des amibes jeunes, n'ayant pas encore atteint leur taille définitive, résistent en général moins bien que les organismes adultes à l'action toxique du sulfate de quinine.

3° *Température* : Les amibes communes de culture ne peuvent guère se développer dans un milieu dont la température dépasse 25°C. Quand ces conditions se présentent, leur sensibilité vis-à-vis de l'alcaloïde est notablement accrue. D'autre part, les amibes peuvent supporter relativement bien des températures inférieures à 20° C ; quand cet abaissement est trop sensible, elles ont tendance à s'enkyster, et il est difficile d'observer leur comportement vis-à-vis de la quinine.

4° *Facteurs individuels* : Les différences obtenues pour une même solution toxique, d'un individu à l'autre, sont d'autant plus grandes que la concentration de la solution est plus faible.

COMPORTEMENT DES AMIBES AU COURS DE L'INTOXICATION :

1° *Intoxication rapide* : Lorsqu'une amibe se trouve plongée dans une solution de sulfate de quinine de concentration relativement élevée (M/2.000 par exemple, soit 0 g. 373 pour 1.000) la cellule devient rapidement immobile et son volume diminue considérablement ; au bout de quelques instants, elle présente une forme légèrement lobée irrégulière, et l'on ne peut constater qu'elle est vivante que par un examen attentif du protoplasme. Cette diminution du volume qui s'observe presque toujours dans les intoxications aiguës, est d'autant plus forte que la concentration d'alcaloïde est plus grande. Au moment de la mort de l'amibe, par contre, le volume cellulaire, dans la plupart des cas, augmente sensiblement et peut même devenir égal au volume primitif ; un peu après survient la désagrégation des éléments cytoplasmiques.

2° *Intoxication lente* : Lorsqu'on observe les amibes soumises à l'action d'une solution alcaloïdique de concentration plus faible (M/2.10⁴ par exemple, soit 0 g. 0373 pour 1.000) on voit les protozoaires, au bout d'un certain temps, se déplacer d'une façon plus lente ; les pseudopodes se font plus rares et l'hésitation que l'amibe présente à s'engager dans une direction déterminée est encore plus marquée. La cellule, enfin, s'immobilise, ébauche encore quelques pseudopodes et prend finalement une forme irrégulièrement lobée, avec une légère diminution de volume. Le plus souvent, on constate une vacuolisation poussée du protoplasme, phénomène qu'avait observé Prowazek (1910) et que

Feiler (M.) (22) a confirmé. Ceci n'est d'ailleurs pas général, car dans certains cas, en effet, il y a une diminution du nombre des vacuoles. Le cytoplasme reste actif pendant quelque temps encore, puis s'immobilise ; après la mort enfin, l'amibe affecte une forme qui varie suivant le pH de la solution employée. Nous aurons bientôt l'occasion de revenir sur ce point. On trouvera exposés dans le tableau VI et la figure II les résultats que nous avons obtenus à l'aide de solutions de sulfate basique de quinine de différentes concentrations et ajustées à pH : 3,2.

Toutes ces observations ont été faites à la lumière artificielle.

Si l'on exprime graphiquement la relation qui existe entre les logarithmes de la concentration et du temps de mort, on obtient la courbe de la figure 2.

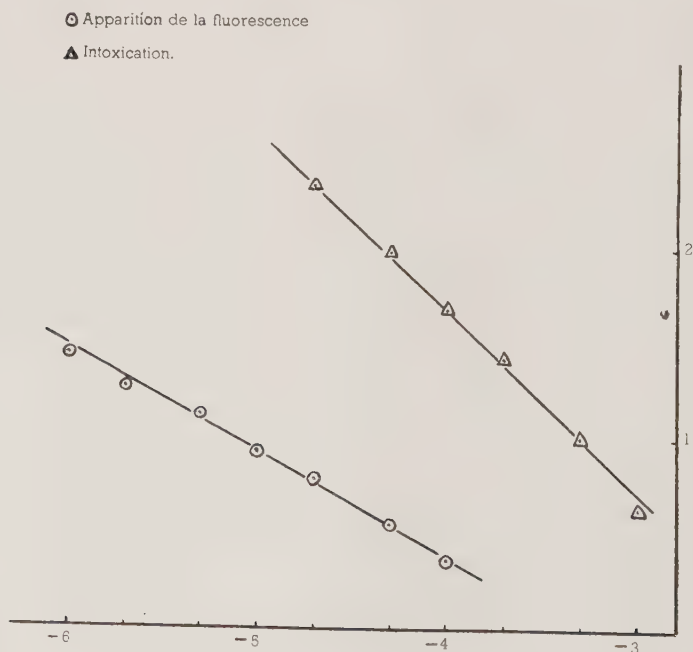


Fig. 2. — Action du sulfate de quinine sur *A. dubia* : Pénétration et intoxication.
 En abscisses : logarithmes des concentrations de sulfate de quinine : (pH : 3,2).
 En ordonnées : logarithmes des temps d'intoxication et d'apparition de la fluorescence chez *A. dubia*.

TABLEAU VI

Toxicité et pénétration du Sulfate de Quinine chez *A. dubia*
(solutions à pH : 3,2 constant).

Concentration solutions C	Log. C	Temps d'appari- tion de la fluores- cence en minutes	Moyennes des expérien- ces t_1	Log. t_1	$C^{0,56t_1}$	Temps d'intoxi- cation en minutes	Moyennes des expérien- ces t_2	Log. t_2	C. t_2
0.3	-3					3,50 4 4,50 4 5 4,50	4,25	0,628	0,00425
0.4.5	-3,301					8 9 9 12 13 11	10,33	1,014	0,00516
0.4.2	-3,70					24 26 27 26 25 30	26,33	1,42	0,00529
0.4	-4	2 2,50 2,50 2 2,50 2,50	2,33	0,367	0,0133	43 53 46 50 48 50	48,33	1,684	0,00483
0.5.5	-4,301	3 3,50 3,50 4 3,50 4	3,58	0,5538	0,0139	72 107 105 108 106 95	98,83	1,994	0,00494
0.5.2	-4,70	6 5,50 7 6 6,50 6 9 8,50	6,16	0,789	0,0145	230 218 245 240 236 234	233,83	2,368	0,0047
0.5	-5	10 8,50 8 9 13	8,83	0,946	0,0140				
0.6.5	-5,301	14 12 13 15 14 18 17	13,50	1,13	0,0145				
0.6.2	-5,70	20 18 19 22 28 27	19	1,278	0,0124				
0.6	-6	25 28 32 30	28,30	1,45	0,0127				

On voit par là l'existence d'une relation linéaire entre les logarithmes de ces deux grandeurs. On en conclut l'existence d'une relation hyperbolique entre la concentration de la solution toxique et le temps au bout duquel survient la mort des organismes : $Ct = K$. Le tableau IV donne également la valeur de K pour chaque concentration étudiée (moyenne de six déterminations).

Si l'on met à part le chiffre correspondant à la solution la plus concentrée, le « temps d'intoxication » étant alors très bref, on voit que la loi se vérifie d'une façon assez nette.

§ II. — ETUDE DE LA PENETRATION DE LA QUININE PAR L'OBSERVATION EN LUMIERE ULTRA-VIOLETTE :

Pour réaliser ces expériences, nous opérons exactement de la même façon en remplaçant simplement les lames porte-objets ordinaires par des lames en verre spécial perméable à la lumière ultra-violette (verre U.V.).

L'observation est ici plus délicate, car l'examen comporte une manipulation plus longue et les phénomènes que l'on veut étudier se succèdent rapidement.

Lorsqu'on observe une amibe en suspension dans une solution sulfurique de sulfate de quinine, la préparation étant soumise à l'action de la lumière ultra-violette, rien ne se détache au début sur le champ bleu sombre du microscope (1) ; puis, brusquement, une petite plage fluorescente apparaît. Indécise au début, et scintillante, la tache lumineuse s'étend à toute la partie périphérique de l'amibe ; elle augmente peu à peu d'intensité et l'on peut bientôt voir se préciser les formes de l'amibe. Alors, on voit se détacher peu à peu sur le fond légèrement éclairé de la surface du protozaire des petites plages fluorescentes, dont la luminosité augmente peu à peu, jusqu'à devenir bleu intense. Ces petites sphères brillantes et de tailles inégales, circulant dans le corps de l'amibe, ne sont autres que les vacuoles di-

(1) Les amibes fraîchement prélevées sur un milieu très nutritif (milieu au blé par exemple) présentent souvent une légère fluorescence spontanée qu'un jeûne de 24 heures fait disparaître en général. Cette luminosité est, sans nul doute, en relation avec la constitution chimique des particules englobées et digérées par l'amibe ; on sait que les peptones et certains amino-acides sont fluorescents. (DHERÉ 17). Nous avons eu l'occasion d'observer par exemple la présence à l'intérieur d'une amibe d'une anguillule imparfaitement digérée, dont tout le corps présentait une vive fluorescence blanc-bleuâtre, et se détachait sur le fond beaucoup plus sombre constitué par le protoplasme de l'amibe.

gestives qui correspondent aux plus grosses sphères, et certaines inclusions cytoplasmiques et vacuolaires, de taille nettement inférieure et ayant également pour la quinine une grosse affinité. Au milieu de cette plage fluorescente, constellée de points brillants, un cercle sombre se détache, correspondant à l'emplacement de la vacuole contractile. Cette absence de fluorescence dans une telle vacuole, même après un temps de contact assez grand avec la solution de quinine, nous permet de déduire que la pénétration de l'alcaloïde dans la vésicule contractile est nulle. Au bout d'un certain temps, l'amibe s'immobilise ; à mesure que l'intoxication progresse, les contrastes entre les différentes régions s'atténuent, les contours se font moins nets. Lorsque l'amibe meurt, la fluorescence qu'elle présente diminue et se réduit à une petite plage circulaire uniformément lumineuse. Cette fluorescence persiste d'ailleurs assez longtemps après la mort et s'atténue progressivement au cours de la dessiccation de la préparation.

Lorsqu'une amibe est placée dans une solution de sulfate de quinine, relativement concentrée ($M/10^4$) et de $pH = 3,2$, la fluorescence que l'on observe dans les vacuoles du protozoaire, faible au début, augmente d'intensité dans de telles proportions que les vacuoles se détachent au bout d'un certain temps sur le fond pourtant éclairé de l'amibe comme des sphères d'un bleu lumineux très intense.

Nous assistons donc, dans ces conditions, à une véritable condensation de l'alcaloïde, en certains points de l'amibe ; ce phénomène est d'autant plus frappant que la fluorescence observée en ces points est incomparablement plus intense que celle que produirait une solution saturée de sulfate de quinine examinée dans les mêmes conditions.

Ces faits sont à rapprocher des résultats d'Irwin (M.) (35) concernant l'accumulation des colorants (Bleu de Crésyl brillant) dans les cellules de *Nitella*.

En comparant les concentrations du colorant dans le liquide extérieur (C_1) et à l'intérieur du suc vacuolaire de ces cellules végétales (C_2) l'auteur a pu mettre en évidence une condensation du colorant, exprimable par l'équation $C_1^{1,50} = C_2$. Il ne peut donc s'agir dans cette pénétration d'un simple processus de diffusion et les faits observés permettent à Irwin d'admettre que le colorant entre en combinaison avec les protéines cellulaires.

Il y a donc lieu d'envisager dans la fixation de la quinine sur la cellule amibienne, l'existence de récepteurs cellulaires, confor-

mément à la théorie énoncée par Clark (13). Notons toutefois que ces récepteurs se trouvent répartis à l'intérieur du protoplasme et ne sont pas localisés à la partie superficielle de la cellule, comme semble l'admettre le pharmacologue d'Edimbourg.

L'ION SO_4 PÉNÈTRE A L'INTÉRIEUR DE L'AMIBE :

Nous venons de voir que sous l'influence du sulfate de quinine, les amibes présentaient une vive fluorescence ; il restait cependant à savoir si cette fluorescence était due à la pénétration de la seule base quinine ou si les ions SO_4^{--} pénétraient également à l'intérieur de la cellule.

Certains auteurs et entre autres Marian M. Crane (16) reprenant la théorie d'Overton (1896) et étudiant l'action physiologique de solutions de sels d'alcaloïde en fonction du pH ont cru pouvoir déduire de leurs expériences que la toxicité de ces solutions était uniquement due à la quantité de base alcaloïdique libre, par conséquent soumise au degré de la dissociation et de l'hydrolyse du sel dissous. En effet, l'alcalinisation de ces solutions accroît leur toxicité.

Cette théorie ne fut pas admise par tous les expérimentateurs ; en particulier Osterhout (1914) démontra par des expériences sur la pénétration des sels chez le *Laminaria* que l'action du pH s'exerçait non seulement sur la substance chimique, mais également sur la cellule elle-même. Du point de vue pharmacodynamique, il est intéressant de rechercher si une cellule réceptrice peut être pénétrée par les ions acide et basique, résultant de la dissociation d'un sel d'alcaloïde, ou si la base alcaloïdique seule est capable de pénétrer la couche externe du protoplasme. C'est donc dans le but de résoudre ce problème que nous avons examiné en lumière de fluorescence des amibes soumises à l'action du sulfate basique de quinine en solution non sulfurique et à $\text{pH} = 4,9$ à 5. Dans ces conditions, nous avons constaté d'une part que le temps d'apparition de la fluorescence était un peu supérieur à celui trouvé pour les solutions de $\text{pH} = 3,2$; d'autre part, nous n'avons jamais obtenu qu'une fluorescence légère, permettant à peine de distinguer les contours de l'amibe. En faisant alors arriver dans la solution baignant l'amibe une goutte d'acide sulfurique N/50, nous avons observé l'apparition d'une vive fluorescence au niveau de l'amibe, à partir du moment où la solution sulfurique parvenait à son contact.

On ne peut admettre que cette action soit liée uniquement à la variation du pH, car le même pH réalisé par addition d'acide

chlorhydrique ne donne chez l'amibe qu'une fluorescence faible et violacée. On peut donc conclure de ces expériences que la base alcaloïdique ne pénètre pas seule à l'intérieur de la cellule, mais qu'elle est accompagnée de l'ion SO_4^{--} dont l'existence se manifeste surtout par une augmentation de l'intensité de la fluorescence.

LOI DE PÉNÉTRATION DU SULFATE DE QUININE :

L'apparition de la fluorescence au niveau de l'amibe prouvant d'une manière irréfutable et directe la pénétration du sulfate de quinine dans la cellule, nous pourrions dès lors étudier la vitesse de pénétration du sel alcaloïde en fonction de la concentration des solutions, en situant le début de la pénétration de l'alcaloïde dans l'amibe d'après le moment où la fluorescence apparaît chez elle. Disons cependant que pour les très faibles concentrations, le temps d'apparition de cette fluorescence ne correspond peut-être pas exactement au début de la pénétration. En effet, pour que la fluorescence soit visible, il faut que, dans l'intérieur de l'amibe, la concentration du sel de quinine devienne suffisante ; d'autre part, pour les fortes concentrations, il est impossible de procéder à des déterminations précises, car l'apparition de la fluorescence a lieu au bout d'un temps inférieur à la durée de la manipulation.

Nous avons établi la relation entre la concentration des solutions et le temps au bout duquel leur pénétration a lieu dans la cellule. On trouvera les résultats obtenus dans le tableau VI et la courbe de la figure 2.

La courbe logarithmique obtenue étant une droite, on en déduit que la relation qui existe entre la concentration des solutions employées et le temps d'apparition de la fluorescence chez les amibes — c'est-à-dire le temps de pénétration de l'alcaloïde dans la cellule — est de forme hyperbolique. Les résultats expérimentaux obtenus satisfont à la relation $C^{0,56} \cdot t_1 = K'$. Le tableau VI donne la valeur de K' pour les différentes concentrations étudiées et l'on peut ainsi constater, comme nous l'avons vu plus haut à propos de l'intoxication des amibes, que la loi énoncée se vérifie d'une manière à peu près constante.

On peut rapprocher de ces données les résultats de Neuschlosz (S.) (62) concernant l'action de la quinine sur les paramécies normales et quinino-résistantes. D'après les chiffres de cet auteur, Clark a déduit la relation existant entre le temps de

survie des paramécies et la concentration utilisée ; cette relation étant, dans les deux cas, de la forme :

$$C^n t = K$$

$n=0,50$ pour les paramécies normales,

$n=0,72$ pour les paramécies quinino-résistantes.

§ III. — INFLUENCE DU pH SUR LA TOXICITE DE LA QUININE

Les expériences que nous venons de relater ont été effectués, dans tous les cas, à $\text{pH} = 3,2$. Nous nous sommes proposé ensuite d'étudier l'influence des variations du pH sur la toxicité et la pénétration du sel d'alcaloïde. Dans ce but, nous avons employé une solution d'une seule concentration $M/5.000$, amenée à des pH variant entre 3,2 et 8, pH que nous n'avons pas dépassé puisque, dans ces conditions, la fluorescence de la concentration de

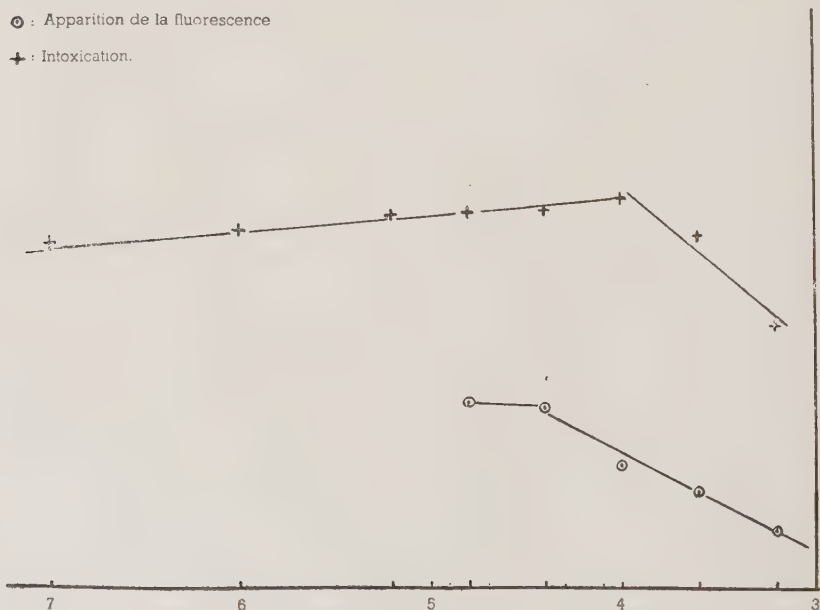


Fig. 3. — Toxicité et pénétration du sulfate de quinine chez *A. dubia* à différents pH. (3,2 à 8,0).

En abscisses : Les valeurs des différents pH, envisagés.

En ordonnées : Logarithmes des temps d'intoxication et d'apparition de la fluorescence.

TABLEAU VII
Toxicité et pénétration du Sulfate de Quinine chez *A. dubia*
à différents pH (3,2 à 8,0)

pH des solutions	Temps d'apparition de la fluorescence en minutes	Moyennes des expériences t_1	log. t_1	Temps d'intoxication en minutes	Moyennes des expériences t_2	log. t_2
3,2	3	2	0,301	22	24,16	1,38
	1,50			19		
	2			21		
	1,50			30		
	2			28		
3,6	4	3,20	0,505	25	71,33	1,85
	3			76		
	3,50			70		
	2,50			67		
	3			75		
4,0	6	4,40	0,640	68	112,50	2,05
	3,50			72		
	5			115		
	4			98		
	3,50			105		
4,4	11	8,80	0,94	110	96,00	1,982
	8			122		
	10			125		
	8			90		
	7			105		
4,8	12	9,40	0,97	103	96,33	1,984
	10			95		
	7			98		
	10			85		
	8			110		
5,2				92	92,83	1,96
				90		
				82		
				100		
				85		
6,0				68	76,66	1,88
				90		
				72		
				70		
				75		
7,0				65	64,50	1,81
				75		
				59		
				62		
				56		
8,0				70	29,66	1,47
				35		
				28		
				23		
				38		
				30		
				34		

quinine employée est nulle, la fluorescence limite étant à $\text{pH} = 7$ environ.

Nous avons rappelé plus haut l'hypothèse émise par Overton à propos de la pénétration des sels d'alcaloïde dans les cellules. Plusieurs autres auteurs et, entre autres, Harvey (1911) et Jacobs (1920) avaient montré que les acides forts et les bases fortes pénétraient très lentement à l'intérieur des amibes, et qu'au contraire, les acides et les bases faibles pénétraient facilement, expliquant par là les différences de toxicité observées en fonction de l'ionisation de ces substances. Nous avons rapporté dans le tableau VII les chiffres expérimentaux obtenus dans l'étude de la toxicité de la quinine vis-à-vis de *A. dubia* aux différents pH envisagés.

La courbe de la figure 3, construite d'après les résultats, nous permet de voir que :

— Dans la zone acide, de $\text{pH} = 3,2$ à $\text{pH} = 4$ la toxicité de la quinine diminue rapidement ; de $\text{pH} = 4$ à $\text{pH} = 5,2$, cette toxicité reste sensiblement constante ; enfin de $\text{pH} = 5,2$ à $\text{pH} = 8$ l'action toxique exercée par l'alcaloïde augmente régulièrement, et nous pouvons constater que cette action est à peu près la même à $\text{pH} = 3,2$ qu'à $\text{pH} = 8$. Si l'on met à part la première partie de la courbe et que l'on considère simplement celle qui correspond à la zone comprise entre $\text{pH} = 4$ et $\text{pH} = 8$, nous constatons que ces données confirment les résultats trouvés par la plupart des auteurs, à savoir que l'action toxique de la quinine augmente avec l'alcalinisation du milieu.

INFLUENCE DU pH SUR LA PÉNÉTRATION DE LA QUININE :

Pour expliquer l'influence du pH sur l'action physiologique d'un médicament, on invoque en général la plus ou moins grande pénétration de ce médicament dans la cellule réceptrice. Dans le but de vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé notre technique de microscopie de fluorescence pour rechercher si les différences de toxicité observées dans l'action toxique de la quinine aux différents pH envisagés, correspondaient à des différences sensibles dans la vitesse de pénétration de l'alcaloïde dans la cellule. Des expériences effectuées dans ce sens aux pH de : 3,2 - 3,6 - 4 - 4,4 - 4,8 et 5,2 nous ont permis de constater qu'il y avait en effet une variation correspondante de cette vitesse de pénétration.

Nous avons résumé dans le tableau VII et la courbe de la figure 3 les résultats obtenus.

L'examen de cette courbe nous permet de voir que dans la

zone comprise entre pH : 3,2 et pH : 4,— une diminution rapide de toxicité, il y avait un ralentissement sensible dans la vitesse de pénétration de l'alcaloïde, mais que dans la zone allant de pH: 4,0 à pH 5,2 on ne pouvait conclure à une variation dans la pénétration du toxique.

D'ailleurs, ces résultats sont sujets à une cause d'erreurs que nous n'avons pu éviter, en raison même du fait que la fluorescence du sulfate de quinine varie, comme nous l'avons vu, avec le pH.

§ IV. — PENETRATION DU ROUGE NEUTRE CHEZ LES AMIBES

Nous avons vu de quelle manière la fixation de la quinine dans la cellule d'un protozaire présentait les memes caractéris-

TABLEAU VIII
Pénétration du rouge neutre chez *A. dubia*

CONCENTRATION des Solutions C	log. C	Temps d'apparition de la coloration rouge en minutes	Moyennes des expériences t	log. t.	C ^{0,80t}
M/1,43.10 ⁴ (1/5.10 ⁴)	—4,16	0,91	1,34	0,127	0,00063
		1,33			
		1,83			
		1,16			
		1,50			
M/2,87.10 ⁴ (1/10 ⁵)	—4,46	2	2,40	0,380	0,00064
		1,83			
		3			
		2,33			
		2,83			
M/5,74.10 ⁴ (1/2.10 ⁵)	—4,76	4	4	0,602	0,00062
		3,50			
		3			
		5			
		4,50			
M/1,43.10 ⁵ (1/5.10 ⁵)	—5,16	10	9,52	0,978	0,00070
		8			
		9,50			
		11			
		12			
M/2,87.10 ⁵ (1/10 ⁶)	—5,46	9	26,20	1,418	0,0011
		28			
		22			
		26			
		30			
		25			

tiques que la fixation d'un colorant vital, comme le rouge neutre. Nous avons donc été amené à chercher suivant quelles modalités un tel colorant se fixe sur les protozoaires, en envisageant plus particulièrement la relation entre le seuil d'apparition du colorant dans les vacuoles et la concentration des solutions employées.

Nous venons de voir que la pénétration de la quinine chez les amibes, mise en évidence par l'apparition de la fluorescence à l'intérieur du protozoaire, était liée à la concentration des solutions alcaloïdiques suivant la loi $C^{0,56t_1} = K'$. La pénétration du rouge neutre est régie également par une équation de la forme $Ct = K$, comme le montrent les chiffres expérimentaux résumés dans le tableau VIII et la courbe de la fig. 4.

Si l'on compare les temps de pénétration du colorant vital à l'intérieur de l'amibe avec les temps de pénétration du sulfate de quinine, on constate que la concentration correspondant au seuil d'apparition de la substance étrangère dans la cellule est à peu près la même dans les deux cas, mais qu'à partir de cette concentration, la pénétration est réalisée plus rapidement dans le cas de la quinine que dans celui du rouge neutre.

ACTIONS SUCCESSIVES DU ROUGE NEUTRE ET DE LA QUININE

CHEZ LES AMIBES :

On sait, depuis les travaux de Bornstein et Reiter réalisés en 1923, sur les paramécies, que non seulement les alcaloïdes se localisent dans le protoplasme aux mêmes endroits que les colorants vitaux basiques, mais que ces colorants, fixés sur les paramécies, peuvent être déplacés par les alcaloïdes.

En 1930, Lauer (A.) (45) observe ce fait sur des animaux inférieurs (trypanosomes, hydres, vers) ; ces animaux, colorés par le rouge neutre ou le bleu de Nil et immergés ensuite dans des solutions d'alcaloïdes (quinine, cocaïne, pilocarpine et caféine), à concentrations égales, subissent une décoloration produite par le déplacement des colorants par les alcaloïdes.

Levin (B.S.) (47) en 1933, confirme ces résultats en montrant que la décoloration des protozoaires ou des tissus animaux, colorés par les colorants vitaux, se fait beaucoup plus rapidement si l'on ajoute des traces d'alcaloïdes aux solutions qui les baignent.

Nous avons voulu vérifier ces données dans le cas des amibes, et, dans ce but, nous avons fait agir sur des individus colorés par une immersion de 10 minutes dans une solution de rouge neutre $1/2.10^4$ ou $M/5,74.10^3$, les différentes concentrations de

sulfate de quinine à pH = 3,2 que nous avons utilisées précédemment. Avant d'être soumises à l'action de l'alcaloïde, les amibes sont lavées avec de l'eau distillée pour les débarrasser de la solution de colorant qui les baigne. Les expériences effectuées dans ces conditions nous ont permis de constater que :

1° La décoloration des amibes était d'autant plus rapide que les solutions d'alcaloïde étaient plus concentrées, et, par conséquent, plus toxiques.

2° Que cette décoloration n'était presque jamais totale, l'amibe étant tuée en général bien avant l'élimination à peu près complète du colorant.

3° Que la toxicité des deux substances (quinine et rouge neutre) agissant simultanément, est plus élevée, comme l'avait

TABLEAU IX

Toxicité et pénétration du Sulfate de Quinine chez *A. dubia* en présence de rouge neutre.

Concentration des solutions C	log. C	Temps d'apparition de la fluorescence en minutes	Moyennes des expériences t_1	log. t_1	$C \cdot 0,71 t_1$	Temps d'intoxication en minutes	Moyennes des expériences t_2	log. t_2	$C^{1,21} t_2$
M.10-4.5	—3,301					2 3 2,50 2	2,37	0,37	0,00034
M.10-4.2	—3,70	7 4 6 5 6	5,60	0,74	0,0132	11 9 8 12 7	9,40	0,97	0,00031
M.10-4	—4,00	17 15 15 13 18	15,60	1,19	0,0225	23 27 21 30 25	25,20	1,40	0,00036
M.10-5.5	—4,301	27 22 30 24 28	26,20	1,418	0,0143	51 45 42 55 38	46,20	1,66	0,00028
M.10-5.2	—4,70	35 32 38 45	37,50	1,57	0,0172	120 138 130 145 120	130,60	2,11	0,00027
M.10-5	—5,00	75 70 85 78	77,00	1,88	0,022	300 env.	300 env.	2,47 env.	0,00026

constaté Lauer, que la toxicité correspondante de la quinine seule. Les résultats de nos expériences sont résumés dans le tableau IX et la courbe de la fig. 4.

L'examen de la courbe logarithmique obtenue, permet de constater qu'il existe également dans ce cas une relation hyperbolique de la forme $Ct = K$, entre le temps de survie des amibes et la concentration des solutions de quinine utilisées.

APPARITION DE LA FLUORESCENCE DE LA QUININE APRÈS ACTION DU ROUGE NEUTRE :

Lorsqu'on examine au microscope à fluorescence une amibe colorée par le rouge neutre (10 minutes dans une solution $1/2.10^4$ ou $M/5,74.10^3$) on ne peut rien distinguer sur le fond bleuté du

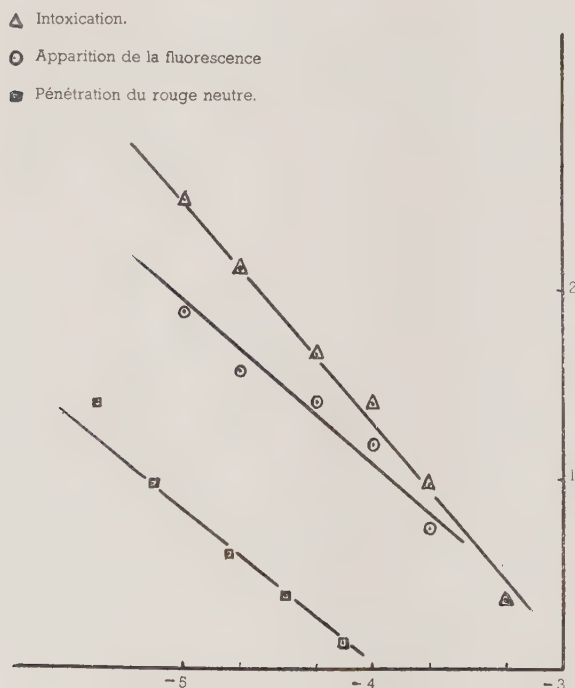


Fig. 4. — Influence du rouge neutre sur la toxicité et la pénétration du sulfate de quinine chez *A. dubia*.

Pénétration du colorant employé seul chez l'amibe.

En abscisses : Logarithmes des concentrations de sulfate de quinine et de rouge neutre.

En ordonnées : Logarithmes des temps d'intoxication, d'apparition de la fluorescence, et d'apparition de la coloration rouge chez l'amibe.

champ du microscope ; mais si l'on fait alors arriver sur la lame une solution de sulfate de quinine, relativement concentrée on voit bientôt apparaître une fluorescence rouge. Cette fluorescence, très légère au début, et localisée surtout à la périphérie de l'amibe, augmente assez rapidement d'intensité à l'intérieur de la cellule. Toutefois, on ne peut déceler en détail la structure du protozoaire ni les éléments où se localise habituellement cette fluorescence, la teinte obtenue étant plutôt diffuse.

En notant le temps au bout duquel apparaît chez les amibes cette fluorescence rouge aux différentes concentrations envisagées, nous avons obtenu les chiffres expérimentaux résumés dans le tableau IX et la courbe de la figure 4.

L'examen de cette courbe nous permet de voir qu'à concentrations égales, les temps d'apparition de la fluorescence de la quinine après action du rouge neutre sont inférieurs à ceux obtenus dans le cas de l'alcaloïde agissant seul.

Cette courbe nous permet également de déduire que, malgré cette action retardatrice exercée par le colorant vital, la relation exprimant l'allure du phénomène est ici aussi de la forme $Ct = K$. La fixation élective des deux substances sur les mêmes inclusions protoplasmiques (inclusions qui auraient un rôle dans les processus d'oxydo-réduction d'après les conclusions d'un récent travail de Roskin (Gr.) (82), expliquerait la plus grande toxicité du mélange d'alcaloïde et de colorant vital.

ELIMINATION DE LA QUININE :

Nous avons étudié précédemment la vitesse de pénétration de la quinine chez les amibes. Nous allons maintenant essayer de suivre l'élimination de l'alcaloïde fixé par les cellules au cours d'un lavage prolongé. Nous avons déjà eu l'occasion de mentionner les travaux de Binet et R. Fabre, confirmés par les recherches de P. Fourment et H. Hermann, sur la fixation de la quinine par les hématies, et l'élimination lente de l'alcaloïde.

Pour étudier cette élimination chez les amibes et voir si le protoplasme du protozoaire est capable de fixer aussi fortement la dose alcaloïdique, nous avons opéré de la manière suivante :

— On immerge un certain nombre d'amibes pendant 20 minutes environ dans une solution de quinine M/10⁴ et de pH = 3,2. Au bout de ce temps, on centrifuge et on lave les amibes une première fois avec de l'eau bidistillée. On centrifuge à nouveau, puis on met le culot obtenu dans un courant d'eau distillée, constamment renouvelé au moyen de l'appareil décrit ci-après :

Un flacon en pyrex d'une contenance de 250 cc. est fermé par un bouchon percé de deux trous. Par un de ces trous, arrive un tube de verre légèrement effilé, qui plonge jusqu'au fond du flacon, et qui assurera l'arrivée du courant d'eau ; l'autre trou est muni d'un dispositif spécial, destiné à la filtration de l'eau de sortie et constitué d'un tube de verre assez gros terminé à angle droit par un petit réservoir recouvert à sa partie supérieure d'une plaque en verre poreux. La hauteur de la plaque dans le récipient conditionne le niveau de l'eau (ce niveau détermine un volume constant de 150 cc. environ de liquide), on assure un débit constant d'eau distillée dont le tuyau d'alimentation peut être plus ou moins fermé par une pince de Mohr, le débit est réglé à environ un litre à l'heure. Afin d'éviter l'influence de la lumière au cours du phénomène, le flacon laveur est entièrement entouré de papier noir.

Les prélèvements sont faits toutes les 1/2 heures au début de l'opération, puis ensuite, toutes les heures. Le volume de la suspension d'amibes prélevé est centrifugé et le culot examiné au microscope à fluorescence.

Après une demi-heure de lavage, la fluorescence a peu diminué ; les contours de l'amibe sont très visibles et les vacuoles et les grosses granulations sont encore très lumineuses (★★★★).

Après une heure, fluorescence diminuée, les contours sont plus flous et les vacuoles moins nettes (★★★).

Après deux heures, fluorescence encore diminuée ; les vacuoles se distinguent à peine ; les contours sont imprécis, mais les amibes sont encore nettement visibles (★★★).

Après quatre heures, fluorescence faible (★★).

Après six heures, fluorescence très faible ; les amibes ne sont plus que de petites plages uniformément fluorescentes ; elles commencent à s'arrondir et n'envoient plus de pseudopodes ; une certaine vacuolisation de leur protoplasme commence à s'apercevoir (★★).

Après huit heures, fluorescence extrêmement faible (limite) ; la plupart des amibes sont complètement sphériques (★).

Après dix heures, la majorité des amibes ne présentent plus de fluorescence. Certaines sont déjà mortes (0).

Après douze heures, aucune fluorescence n'est plus visible. La majorité des amibes sont mortes et ne sont plus que de petites sphères régulières avec un endoplasme contracté centrique ou excentrique à l'intérieur de la cellule. Aucun mouvement de trépidation n'est visible (0).

Après 24 heures, les amibes sont toutes sphériques, mais les

inclusions cytoplasmiques sont animées de mouvements assez rapides (0).

Il ressort de ces expériences que la quinine fixée sur les différents constituants cellulaires ne forme pas avec ceux-ci une combinaison irréversible, ce qui confirme l'opinion de Clark sur les conditions de fixation des substances médicamenteuses sur les récepteurs cellulaires.

Il nous faut remarquer cependant que, si la méthode de lavage des amibes en courant continu permet une élimination rapide de l'alcaloïde, elle exerce toutefois sur les protozoaires une certaine action toxique, puisque, dans de telles conditions, la vie des individus en expérience n'excède pas 12 à 14 heures.

CHAPITRE V

L'action de la quinine chez les Amibes en présence de différentes substances : Saponines, Savons, Sels biliaires

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié de quelle manière varient la toxicité et la pénétration de la quinine chez les amibes en fonction de la concentration et du pH des solutions alcaloïdiques. Nous avons pensé qu'il serait également intéressant de rechercher l'influence qu'exercent, sur ces mêmes phénomènes, d'une part des substances réputées actives sur la perméabilité cellulaire, et, d'autre part, des produits doués dans certains cas d'un pouvoir anti-toxique : le sérum sanguin et la lécithine.

§ I. — ACTION DES SAPONINES

Les saponines constituent, comme on le sait, des substances très toxiques pour le protoplasme. En concentrations suffisantes, « elles arrêtent les mouvements des cils vibratiles et tendent à désintégrer toutes les cellules. *In vitro*, elles détruisent les hématies par hémolyse ». (Zunz) (104).

D'autre part, la plupart des auteurs sont d'accord pour affirmer que les saponines renforcent la toxicité de certains alcaloïdes. En 1927, Annau et Hergloz (1) observent que chez la grenouille l'action toxique du curare, de la strychnine et de la picrotoxine est augmentée en présence de saponine ; il en est de même chez le lapin en ce qui concerne l'action de la morphine et de la cocaïne.

Cette augmentation de toxicité semble liée à une action sur la perméabilité cellulaire. On a observé par exemple que la saponine

nine favorise la résorption intestinale des ions magnésium, permettant ainsi d'obtenir une narcose profonde chez les souris avec des doses relativement faibles de sulfate de magnésie.

Dès 1920, Jacoby trouve d'ailleurs que la palmure de grenouille normalement imperméable à l'adrénaline, devient perméable en présence de saponine.

En 1932, Labes et Schlenkert (T.H.) (41) confirment les résultats obtenus quelques années auparavant par Kofler (L.) (39) : la saponine accroît la perméabilité des muqueuses pour de nombreuses substances.

Cette propriété que possède la saponine d'augmenter la toxicité et la pénétration de certains médicaments peut être inhibée par certaines substances.

C'est ainsi que Kofler (L.) (39) en 1929, conformément à ce que Ranson avait trouvé auparavant, montre le rôle protecteur que jouent le cholestérol et le sérum sanguin vis-à-vis de l'action hémolytique de la saponine ; l'auteur pense que ce phénomène serait dû à la formation d'une combinaison saponine-cholestérol ou d'un complexe d'adsorption avec les colloïdes du sérum.

Cependant, d'après Ponder (E.) (73) l'action protectrice du sérum ne serait pas due principalement aux matières lipoidiques, mais surtout aux matières protéidiques qui existent en quantité plus grande.

Levin (B.S.) (47) étudiant l'influence de la lécithine sur l'action cytolysante de la saponine pour *Paramecium aurelia* a mis, là aussi, en évidence une action antitoxique de la lécithine pour la saponine.

Résumons brièvement les diverses hypothèses émises à propos de l'action qu'exerce la saponine sur la perméabilité cellulaire.

Pour Pascucci (O.) (70) cette augmentation de la perméabilité serait due à une rupture d'équilibre entre le cholestérol et la lécithine dans la membrane cellulaire.

Tiffeneau, conformément à la théorie de Traube, attribue cette action à l'abaissement de la tension superficielle des solutions employées ; cet abaissement faciliterait le passage de la substance à travers la couche externe cellulaire.

Pour étudier l'influence de la saponine sur la toxicité et la pénétration de la quinine chez les amibes, il était indispensable d'éviter une action toxique de la substance lytique et, il nous fallait, pour cela, employer une solution de concentration telle qu'elle permette la vie des amibes pendant un temps relativement

long ; les concentrations de quinine utilisées étant les mêmes que précédemment. Nous nous sommes toujours placés dans ces conditions pour l'étude des autres substances lytiques envisagées.

TECHNIQUE :

Dans les petits tubes à hémolyse, on mélange 0 cm³ 3 de la suspension d'amibes avec 0 cm³ 3 d'une solution de saponine de concentration double de celle à étudier. On agite soigneusement et on prélève de temps en temps une goutte du mélange qu'on examine entre lame et lamelle.

Les fortes concentrations de saponine tuent rapidement les amibes ainsi que la plupart des microorganismes qui les accompagnent dans les milieux utilisés (infusoires, rotifères, etc.).

Sous l'effet d'une solution au 1/20 par exemple, les amibes rétractent rapidement leurs pseudopodes et revêtent assez vite la forme sphérique irrégulièrement lobée ; cet aspect n'est d'ailleurs pas caractéristique, les amibes réagissant de la même manière en présence de la plupart des substances toxiques utilisées en fortes concentrations.

Le protoplasme est ensuite le siège de quelques violents soubresauts, dont l'amplitude diminue peu à peu ; l'amibe se contracte encore un peu, puis, dans la majorité des cas, éclate brusquement, le contenu cellulaire se répandant dans le milieu ambiant. Cet accident n'est pas toujours fatal pour l'amibe ; très souvent, en effet, après expulsion d'une partie de son protoplasme, elle peut continuer à progresser, en revêtant dans la plupart des cas, la forme limax. Bientôt, cependant, elle s'immobilise, et est lysée complètement peu après.

Les solutions plus diluées de saponine (1/200, 1/400) n'ont pas les mêmes effets : la contraction préalable dont nous venons de parler, ne se produit que très rarement. Au contraire, on a l'impression que l'amibe est devenue plus fluide, plus étalée et qu'elle coule en quelque sorte sur son support avec une grande facilité, revêtant souvent des formes irradiées, étirées (Planche II, fig. 2).

L'aspect peut aussi se modifier ; le protoplasme devenu plus transparent (par suite, peut-être, de la moindre épaisseur de l'amibe, qui a augmenté de surface), est bordé par une bande mince d'ectoplasme. Il arrive cependant qu'au début du contact avec la solution de saponine, le protozoaire reste immobile pendant quelques instants ; puis, sans émettre de pseudopodes nets, prend une forme elliptique, légèrement lobée et donnant l'im-

pression d'être facilement déformable. Le stade final de la lyse cellulaire n'est pas toujours observé avec des solutions très diluées.

Nous avons résumé dans le tableau X les résultats obtenus concernant l'action toxique de la saponine sur les amibes.

TABLEAU X
Toxicité de la Saponine
en solution aqueuse pour *A. dubia*

CONCENTRATIONS des solutions	Temps d'intoxication en minutes	MOYENNES des expériences
1/10 ²	5	5,75
	7	
	6	
	5	
1/10 ^{2.5}	20	19,50
	18	
	22	
	18	
1/10 ²	62	64,75
	65	
	60	
	72	
1/10 ^{2.2}	150	142
	140	
	138	
	140	
1/10 ^{2.4}	220	243,75
	250	
	245	
	260	
1/10 ^{2.5}	320	325
	325	
	335	

INFLUENCE DE LA SAPONINE SUR L'ACTION TOXIQUE DE LA QUININE :

Etant donné la notion couramment admise d'après laquelle la saponine augmenterait la perméabilité cellulaire, on devrait logiquement s'attendre à ce que la pénétration du sulfate de quinine à l'intérieur de l'amibe fût plus rapide en présence de saponine, et que, par conséquent, l'action toxique de l'alcaloïde se produisît plus rapidement. Toutefois, les expériences que nous avons effectuées dans ce sens nous ont donné des résultats opposés.

En faisant agir sur *A. dubia*, en présence d'une dose de saponine pratiquement dépourvue de toxicité (1/400 ou 2,50 pour 1.000), des solutions de sulfate de quinine de différentes concentrations, nous avons obtenu des durées de survie supérieures à celles que nous avons observées dans le cas de la quinine seule.

Pour réaliser ces expériences, nous avons suivi à peu de choses près la méthode que nous avons décrite à propos de l'étude de la toxicité de la quinine en fonction de la concentration des solutions. Nous avons opéré, là également, à la valeur 3,2 du pH qui correspond au maximum de fluorescence.

TECHNIQUE :

Dans deux tubes à hémolyse, on met 0 cm³ 3 d'une suspension d'amibes relativement riche.

Dans le premier tube (témoin) on ajoute : 0 cm³ 3 d'eau distillée.

Dans le deuxième tube on ajoute : 0 cm³ 3 d'une solution de saponine à 1 %. On agite soigneusement les deux tubes de façon à réaliser un mélange homogène. Au bout d'un minute environ, on ajoute dans les deux tubes 0 cm³ 6 d'une solution de quinine de concentration double de celle que l'on veut étudier. On mélange de nouveau, très soigneusement.

On prélève alors, à des intervalles d'autant plus longs que la concentration de quinine est plus faible, une goutte de la préparation que l'on examine entre lame et lamelle.

Lorsque les solutions étudiées sont très concentrées et par conséquent fortement toxiques, les amibes subissent une contraction de tout le protoplasme ; la cellule immobilisée est encore agitée de quelques soubresauts, puis se désagrège rapidement, mais l'allure de l'intoxication est plus facilement observable et plus caractéristique lorsqu'il s'agit de solutions moins concentrées. La contraction préalable que nous venons de noter n'existe souvent pas ; le protozoaire rétracte cependant ses pseudopodes, mais avec moins de brusquerie que dans le cas de la quinine seule ; toutefois, le volume de la cellule ne varie guère. On observe même une augmentation de la surface cellulaire, et, pendant quelque temps, l'amibe progresse facilement en affectant généralement la forme *limax*. La fluidité du protoplasme amibien est également augmentée et l'on observe, par suite de l'abaissement de la tension superficielle, les formes étirées rencontrées dans l'intoxication par la saponine seule, mais plus rarement, toutefois.

A la mort, les amibes affectent des formes qui diffèrent peu

TABLEAU XI

Toxicité et pénétration du Sulfate de Quinine chez *A. dubia*
en présence de Saponine à 2,50/1.000.

Concentration des solutions C	log. C	Temps d'apparition de la fluorescence en minutes	Moyennes des expériences t_1	log. t_1	$C^{0,79}t_1$	Temps d'intoxication en minutes	Moyennes des expériences t_2	log. t_2	$C \cdot t_1, t_2$
M.10-3	—3					4 4 3 5 2,50 3	3,56	0,553	0,000225
M.10-4,5	—3,301					13 12 12 11 8 13	11,50	1,06	0,00027
M.10-4,2	—3,70					38 42 41 34 40 37	38,66	1,587	0,00025
M.10-4	—4					92 110 95 90 104 115	101	2,004	0,00025
M.10-5,5	—4,301	3,50 3 2,50 4 3	3,20	0,505	0,00128	235 210 195 215 208 205	211,33	2,325	0,000201
M.10-5,2	—4,70	9 7 8 9 8	8,20	0,913	0,00178	375 405 395 380	388,7	2,589	0,000102
M.10-5	—5	14 16 12 17 18 15	15,33	1,185	0,00172	10 à 12 h.			
M.10-6,5	—5,301	25 21 27 28 24	25	1,398	0,00162				
M.10-6,2	—5,70	46 38 41 48 43	43,20	1,635	0,00135				

des formes obtenues avec le sulfate de quinine : la cellule est sphérique et l'on observe à l'intérieur d'une membrane nettement visible, l'endoplasme très contracté entouré complètement par l'ectoplasme ou accolé à la paroi de la cellule.

Si nous comparons les chiffres du Tableau XI avec ceux obtenus dans l'intoxication des amibes par le sulfate de quinine seul, nous constatons qu'en présence de saponine l'action toxique de la quinine est diminuée.

La saponine exerce donc sur la quinine une action anti-toxique très nette ; les amibes conservent plus longtemps dans ces conditions, une taille à peu près normale ; elles se meuvent dans le milieu toxique alors que, dans une solution de quinine de même concentration, et en l'absence de saponine, elles s'immobilisent très vite en subissant une contraction appréciable.

INFLUENCE DE LA SAPONINE SUR LA PÉNÉTRATION DE LA QUININE

La diminution de toxicité observée pour la quinine en présence de saponine est-elle due à la formation d'un complexe quinine-saponine, moins toxique pour les amibes, ou bien est-elle due à une perméabilité différente de la cellule ?

C'est pour essayer de trancher cette question que nous avons étudié l'influence de cette substance lytique sur le temps d'apparition de la fluorescence chez les amibes traitées par la quinine.

Les expériences que nous avons effectuées dans ce but, au moyen de la méthode que nous avons décrite précédemment, nous ont permis de constater qu'en concordance avec le retard observé dans l'intoxication, il existe également un retard dans la pénétration de la quinine ; de plus, le taux de fixation de l'alcaloïde est ralenti, l'intensité de la fluorescence en présence de saponine, augmentant en effet beaucoup plus lentement.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XI.

Les courbes des figures V et VI permettent d'interpréter plus aisément les résultats obtenus.

§ II. — ACTION DES SAVONS

La deuxième catégorie de substances lytiques dont nous avons envisagé l'influence sur l'action pharmacologique de la quinine comprend les savons alcalins. Nous avons choisi parmi ceux-ci celui dont l'action lytique est plus marquée : le Ricinoléate de sodium.

Très étudié, surtout dans ces dernières années, ce savon pos-

sède un pouvoir cytolytique encore plus fort que celui de la saponine.

Les premiers travaux importants publiés concernent surtout son action bactéricide. En 1925, en effet, Larson (W.P.) avec Nelson (E.) (44) découvrait le phénomène qui porte son nom ; une culture virulente de pneumocoques, par exemple, traitée par le Ricinoléate de sodium à 1/1.000 devient avirulente, mais conserve ses propriétés antigènes : le sérum d'un lapin traité, protège un lapin normal contre l'infection par le pneumocoque.

La même année, Larson, Evans et Nelson (43) ont montré que le Ricinoléate de sodium était, de tous les sels d'acides gras, celui qui avait les propriétés détoxiquantes les plus marquées vis-à-vis du pneumocoque.

Deux ans après, Reznikoff (P.) (75) utilisant *A. proteus* comme animal d'expérience, montra que, par micro-injections dans le protoplasme de l'amibe, le Ricinoléate de sodium présente une action toxique de même ordre que celui que l'on observe en immergeant les amibes dans une solution de ce corps, de même concentration.

Dans les deux cas, on observe une liquéfaction du « plasma-lemma ».

De tous les savons étudiés, le Ricinoléate de sodium est de beaucoup le plus toxique.

Page (H.), Shonle (H.A.) et Clowes (G.H.A.) (67) étudiant, en 1933, l'action cytolytique de savons sur les œufs d'oursins, ont attiré l'attention sur le comportement particulier du Ricinoléate de sodium, dont l'action toxique est maximum en milieu acide (pH : 5,8 à 6,2), à l'opposé de ce que l'on constate pour les savons du type de l'Oléate de sodium, qui sont plus actifs en solution alcaline.

Medveczki (A.) et Votin (L.) (55) considérant également l'influence du pH sur l'action hémolytique du Ricinoléate de sodium, trouvent des résultats du même ordre.

Cet effet cytolytique particulier du ricinoléate de sodium semble pouvoir être attribuée à son action sur les constituants cellulaires lipoïdiques : lécithine, cholestérol, ainsi qu'il ressort des travaux de G. Valette et R. Cavier (95) (96).

Nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier dans le cas qui nous occupe, l'influence du ricinoléate de sodium sur la pénétration de la quinine dans les cellules. En nous plaçant dans les conditions expérimentales que nous avons réalisées dans le cas de la saponine, nous avons d'abord déterminé la toxicité propre de ce savon. Nous avons employé pour ces expériences,

en nous inspirant des données fournies par M. Picon (72) une solution résultant de la saturation incomplète de l'acide ricinoléique par la soude, la base étant ajoutée en quantité juste nécessaire pour avoir, à 20°, une solution limpide de pH : 7,2. Cette solution est donc constituée par un mélange d'acide ricinoléique et de ricinoléate de sodium. Par suite de l'hydrolyse partielle du savon en solution diluées, nous avons obtenu, à partir de cette solution mère, des liquides opalescents, d'apparence colloïdale.

En étudiant la durée de survie des amibes, en fonction de la concentration des solutions de Ricinoléate de sodium, nous avons obtenu les résultats donnés dans le tableau XII.

TABLEAU XII
Toxicité du Ricinoléate de sodium
pour *A. dubia*

CONCEN- TRATIONS des Solutions	Temps d'intoxication en minutes	Moyennes des expériences
1/10 ³	3	4
	5	
	4	
	3	
	5	
1/10 ^{3.2}	11	10,40
	9	
	10	
	12	
	10	
1/10 ^{3.5}	32	31,60
	35	
	29	
	34	
	30	
1/10 ⁴	80	82,40
	85	
	92	
	80	
	75	
1/10 ^{4.2}	165	179,40
	175	
	192	
	180	
	185	

De toutes les substances que nous avons étudiées, le Ricinoléate de sodium présente la plus grande toxicité pour les organismes microscopiques.

Pour les fortes concentrations, 1/200 à 1/1.000 environ, les amibes sont tuées instantanément ; la lyse protoplasmique et la désagrégation cellulaire se faisant avec une rapidité telle que le phénomène ne peut être suivi d'une façon détaillée.

Avec les concentrations moyennes, quoique celles-ci soient encore très toxiques, l'observation du phénomène est possible et, pour pouvoir suivre dès le début les réactions du protozoaire au contact de la solution du savon, nous avons opéré de la manière suivante :

Sur une lame propre, portant comme d'habitude, deux traînées de paraffine, nous laissons tomber une goutte de notre suspension d'amibes dans l'eau distillée ; après avoir recouvert d'une lamelle, nous déposons sur un des bords de cette lamelle une goutte d'une solution de Ricinoléate de sodium, à une concentration de 1/500 par exemple ; nous faisons alors lentement pénétrer la solution toxique sous la lamelle en aspirant par le bord opposé avec une bande de papier buvard. Il faut éviter, l'amibe étant bien mise au point, une pénétration du liquide qui transporterait le protozoaire hors du champ. D'autre part, pour savoir exactement le moment où la solution de Ricinoléate de sodium atteint l'amibe, nous l'avons colorée très légèrement avec du rouge neutre.

Dès que la solution toxique arrive au contact de l'amibe, celle-ci réagit immédiatement en rétractant ses pseudopodes ; elle s'arrondit, augmente légèrement de volume ; le protoplasme est agité pendant quelques secondes de violents soubresauts, puis la cellule éclate et le protoplasme se répand dans toutes les directions ; toutes les granulations, les inclusions se dissolvent et disparaissent, le noyau étant le dernier à subir cette action. Projeté au dehors, il augmente de volume, devient plus transparent et est également lysé.

Pour des solutions plus diluées, mais encore très toxiques, le phénomène est plus facilement observable. Là aussi, l'amibe au contact de la solution toxique rétracte ses pseudopodes, et devient sphérique. Peu à peu, toute constitution vacuolaire disparaît, la transparence du contenu cellulaire augmente et le noyau devient bien visible. Au bout de quelques instants, la sphère éclate, et son contenu, presque totalement lysé, se répand lentement dans la solution ambiante.

On peut distinguer dans le noyau, un anneau externe bleuté, très réfringent, et une partie centrale également bleutée, séparés par un anneau optiquement vide ; la couche externe, cède, se fragmente, la substance chromatique précipite à l'intérieur du

noyau, qui se gonfle et éclate ; et il ne reste plus à la place de l'amibe, que quelques granulations réfringente qui finissent de se dissoudre. Enfin, aux concentrations relativement faibles, pour lesquelles cependant l'action lytique subsiste, il arrive que certaines amibes subissent une cytolyse partielle, et après avoir laissé de côté la partie lysée, peuvent redevenir entières et évoluer sur la lame. L'action cytolytique vraiment extraordinaire du Ricinoléate, est de beaucoup supérieure à celle de la Saponine, à concentration égale.

INFLUENCE DU RICINOLÉATE DE SODIUM SUR LA TOXICITÉ
DE LA QUININE :

Pour étudier l'influence du Ricinoléate de sodium sur l'action toxique de la quinine, nous nous sommes placé dans les conditions expérimentales analogues à celles que nous avons décrites à propos de l'étude de l'action de la Saponine.

Nous avons utilisé pour cela une solution de Ricinoléate de sodium à 1/5.000. Par suite des dilutions successives, avec la suspension d'amibes et la solution de quinine, la concentration de Ricinoléate de sodium obtenue finalement, est donc de 1/20.000, concentration qui tue les amibes en un temps moyen de 180 minutes. Etant donnée l'action cytolytique intense qu'exerce le Ricinoléate de sodium, on devrait s'attendre logiquement à constater une accélération de la pénétration de l'alcaloïde, et par suite, une augmentation de la toxicité.

Contrairement à ces prévisions, on constate une diminution de la toxicité de l'alcaloïde, comme dans nos expériences sur la saponine ; mais ce phénomène présente ici une netteté plus remarquable.

Le tableau XIII résume l'ensemble de nos résultats expérimentaux. Cette action est d'autant plus curieuse que l'on constate dans ces conditions une plus grande sensibilité à la quinine des Infusoires, des Rotifères, et de la plupart des autres microorganismes du milieu.

Même pour des concentrations relativement fortes de l'alcaloïde, (M/5.000 par exemple), le protozoaire peut, pendant un certain temps, évoluer normalement ; pour les très fortes concentrations cependant, les amibes s'immobilisent un moment, se contractent même quelquefois, mais cet état ne dure pas longtemps.

En général, une amibe ainsi traitée, présente un protoplasme d'aspect plus fluide et plus transparent ; la cellule augmente même souvent un peu de surface. Au moment de la mort, elle

rentre lentement ses pseudopodes, évolue pendant un certain temps sous la forme *limax* et enfin, s'arrête ; l'amibe prend alors l'aspect d'une sphère mamelonnée à l'intérieur de laquelle les mouvements du protoplasme deviennent de plus en plus lents ; la lyse cellulaire est ici très lente, commence en général par les parties externes du protozoaire, et est rarement complète.

L'action cytolytique intense que possède le Ricinoléate de ne peut s'exercer entièrement quand celles-ci ont été préalable-sodium, à concentrations relativement fortes, sur les amibes, ment soumises à l'action du Sulfate de quinine.

La lyse ne se manifeste alors que dans les parties supersodium, à concentrations relativement fortes, sur les amibes, est restée plus longtemps en contact avec la solution de quinine, et que la concentration de celle-ci, d'autre part, est plus forte.

Avec les très fortes concentrations, nous avons remarqué qu'un petit nombre d'amibes ne résistent pas ; comme sous l'action des fortes concentrations de Ricinoléate de sodium, elles sont lysées et pulvérisées en quelques secondes.

Pour les concentrations moyennes, les amibes ne semblent pas incommodées au début. Au bout d'un certain temps cependant, elles ont tendance à prendre, pour progresser, la forme *limax* ; à la mort, la désagrégation cellulaire est rarement suivie d'une lyse complète de la cellule. La courbe concentration/temps est, comme dans le cas de la saponine, formée de deux portions rectilignes ; les toxicités pour les faibles concentrations étant inférieures à celles auxquelles on devrait s'attendre d'après l'allure de la première partie du graphique.

INFLUENCES DU RICINOLÉATE DE SODIUM SUR LA PÉNÉTRATION DE LA QUININE :

Après avoir constaté l'action protectrice que possède le Ricinoléate de sodium vis-à-vis de la quinine, nous avons voulu savoir, si, comme dans le cas de la Saponine, ce retard à l'intoxication correspondait à un retard dans la pénétration de l'alcaloïde dans la cellule.

En effectuant nos expériences comme dans le cas précédent, nous avons effectivement constaté que l'apparition de la fluorescence chez les amibes demandait un laps de temps beaucoup plus grand que dans le cas des amibes traitées par la quinine seule.

D'autre part, dans ces conditions, l'intensité de la fluorescence augmente également très lentement.

Les résultats sont mentionnés dans le tableau XIII et les courbes des figures V et VI.

TABLEAU XIII

Toxicité et pénétration du Sulfate de quinine chez *A. dubia* en présence du Ricinoléate de sodium au 1/20.000

Concentration de solutions C	log. C	Temps d'apparition de la fluorescence en minutes	Moyennes des expériences t_1	log. t_1	C.0,41 t_1	Temps d'intoxication en minutes	Moyennes des expériences t_2	log. t_2	C.0,50 t_2
M.10-3	—3	}				48 55 47 58	52	1,716	1,64
M.10-4.5	—3,301	}				83 110 88 85 95	92,20	1,964	2,06
M.10-4.2	—3,70	10 16 13 12	12,75	1,105	0,387	170 150 125 137	145,50	2,16	2,05
M.10-4	—4	18 24 16 17 18	18,60	1,27	0,427	190 205 215 180	197,50	2,295	1,97
M.10-5.5	—4,301	26 30 23 22	25,25	1,402	0,383	245 210 310 260	276,25	2,44	1,95
M.10-5.2	—4,70	35 30 38 32	33,75	1,528	0,398	420 env.	420 env.	2,62 env.	1,87
M.10-5	—5	48 43 38 39	42	1,623	0,375				
M.10-6.5	—5,301	50 58 65	57,66	1,760	0,387				

§ III. — ACTION DES SELS BILIAIRES

L'action cytolytique des sels biliaires est un phénomène connu depuis longtemps. Cette action a été mise en évidence en particulier dans le cas des hématies et des bactéries (phénomènes de Neufeld sur le pneumocoque).

On a voulu attribuer à la tensioactivité, des solutions aqueuses des sels biliaires, l'action qu'elles déterminent sur la cellule en modifiant sa perméabilité ; mais il est probable que l'on doit envisager d'autres causes pour expliquer les faits observés.

Nous avons vu que, pour démontrer l'importance de la tension superficielle dans les phénomènes de pénétration des toxiques, Lopez Lomba avait utilisé des sels biliaires dans ses expériences sur les Epinoches.

D'après Wieland l'acide desoxycholique aurait une grande affinité pour le cholestérol, les acides gras, et autres substances organiques avec lesquelles il forme des combinaisons. Ceci expliquerait la toxicité relativement faible que cet acide possède par voie veineuse.

En 1936, Holste (A.) (32) a montré que les propriétés pharmacologiques des acides biliaires sont particulièrement nettes dans le cas des acides cétoniques ; c'est ce qui ressort de l'étude de l'action irritante, de la toxicité et de l'action hémolytique de l'acide déhydrocholique en particulier.

Tout dernièrement, Dopter (Ch) et Deschiens (R.) (18), dans leurs recherches concernant l'action stimulante qu'exerce le sérum ictérique sur le développement des amibes, ont constaté que les sels biliaires ne sont pas stimulants pour les amibes dysentériques, et qu'ils sont même empêchants à la concentration de 15 pour mille (taux du liquide duodénal).

Pour réaliser nos expériences sur l'influence exercée par les sels biliaires sur la toxicité et la pénétration de la quinine chez *A. dubia*, nous avons utilisé le sel biliaire le plus courant, le cholate de sodium.

Afin de choisir une concentration peu toxique, et pour nous placer dans les mêmes conditions d'expérience que précédemment, nous avons au préalable étudié la toxicité propre de cette substance.

Le tableau XIV résume les résultats de nos expériences.

La toxicité du cholate de sodium sur les amibes, se manifeste par une action très nette sur le protoplasme.

Aux fortes concentrations (1/100 et 1/200 par exemple), pour lesquelles les temps de survie sont très courts, la substance

protoplasmique subit des modifications qui sont plus marquées qu'avec la saponine.

Les amibes, plongées dans de telles solutions, rétractent rapidement leurs pseudopodes, sans que le volume de la cellule varie notablement ; l'amibe prend alors une forme régulièrement

TABLEAU XIV
Toxicité du Cholate de sodium
pour les Amibes (*A. dubia*)

CONCENTRATIONS	Temps d'intoxication en minutes	MOYENNES
1/10 ^{2.2}	7	6,50
	6	
	8	
	5	
1/10 ^{2.5}	20	21,75
	25	
	18	
	24	
1/10 ³	45	43,00
	42	
	47	
	38	
1/10 ^{3.2}	80	73,00
	72	
	65	
	75	
1/10 ^{3.4}	118	113,75
	105	
	120	
	112	
1/10 ^{3.5}	135	138,75
	145	
	140	
	135	

lobée qui évolue, à mesure que l'intoxication progresse, vers la forme sphérique. Très peu de temps avant la mort, il se produit dans le protoplasme un bouillonnement particulier, comme si la couche limitante cellulaire ayant brusquement cédé, il y avait eu irruption du milieu ambiant à l'intérieur de l'amibe. Celle-ci est tuée dans les secondes qui suivent. L'action lytique du cholate de sodium survient alors d'une façon nettement visible : l'amibe devient translucide à tel point, que, sans son enveloppe sphérique externe, elle serait à peine visible sur le champ éclairé du microscope. Le noyau devient mieux perceptible par

suite de l'accroissement de sa réfringence ; la couche limitante cellulaire qui, ici, a pris l'aspect d'une membrane réelle (cette couche possède une épaisseur propre et une réfringence différente de celle du protoplasme) peut parfois céder en certains points et il se forme une petite hernie ou protubérance sphérique (« bleb » des auteurs anglais). Le mouvement de trépidation des granulations que nous avons remarqué après la mort dans le cas de l'intoxication par certaines substances, ne commence ici qu'un certain temps après la mort de l'amibe, ce qui pourrait s'expliquer, d'après Brinley (F.J.) (7) par une liquéfaction du contenu cellulaire, faisant suite à une coagulation primitive réversible.

Si nous comparons l'action exercée par les solutions toxiques de Cholate de sodium sur les amibes, avec celles exercées par les solutions de Ricinoléate de sodium, nous constatons qu'il existe une différence assez importante entre elles : alors que le Cholate de sodium possède un pouvoir lytique très puissant sur le protoplasme amibien, il ne peut, dans la majorité des cas, détruire la membrane externe formée. L'amibe tuée par le sel biliaire a presque toujours l'apparence d'une petite sphère, remplie d'un liquide de la même réfringence que le milieu ambiant (ce qui rend très difficile sa recherche) et où l'on peut à peine distinguer par une mise au point soignée, quelques granulations non totalement lysées.

Le Ricinoléate de sodium, lui, dissout la cellule entière et l'on n'observe que rarement cette condensation de la couche limitante en une membrane épaisse ; la désagrégation de l'amibe débute justement sur la surface externe du protozoaire, et le stade final montre à peine quelques granulations réfringentes éparses à l'endroit où se trouvait la cellule primitivement (effet lytique et dispersif du ricinoléate de sodium).

Nous essayerons un peu plus loin d'interpréter cette différence d'action, étant donnée la structure lipoprotéidique de la couche externe cellulaire par les résultats des expériences de G. Valette et R. Cavier (96), d'une part, de Charonnat (12) et de Machebœuf et Tayeau (49), d'autre part, concernant l'action de ces deux sortes de substances sur les constituants lipidiques de cette couche.

INFLUENCES DU CHOLATE DE SODIUM SUR LA TOXICITÉ DE LA QUININE :

Contrairement à ce que nous avons vu pour la Saponine et le Ricinoléate de sodium, le Cholate de sodium augmente d'une

façon notable la toxicité du sel de quinine considéré ; c'est ce qui résulte de l'examen du tableau XV et de la courbe correspondante de la figure 5.

TABLEAU XV

Toxicité et pénétration du Sulfate de Quinine chez *A. dubia*
en présence de Cholate de Sodium au 1/4.000

Concen- tration des solu- tions C	log. C	Temps d'appari- tion de la fluores- cence en minutes	Moyenne- des expérien- ces t_1	log. t_1	C.0,717 t_1	Temps d'intoxi- cation en minutes	Moyennes des expérien- ces t_2	log. t_2	C.1,1 t_2
M.10-4.2	—3,70	}				3 2,50 3,50	3,20	0,505	0,00027
						3 4			
						7			
						10			
M.10-4	—4	}				5 8 7	7,4	0,87	0,00029
M.10-5.5	—4,301	}				21 17 16 22	19	1,28	0,00035
M.10-5.2	—4,70	}	2,25	0,35	0,00096	42 30 32 35 45	37,60	1,575	0,00026
M.10-5	—5	}	3,80	0,58	0,00098	78 105 90 95	92	1,96	0,00029
M.10-5.5	—5,301	}	7,10	0,85	0,0011	8 5,50 7 8 7			
M.10-6.2	—5,70	}	11	1,08	0,00090	9 12 12 11			
M.10-6	—6	}	19,50	1,29	0,00096	20 19 21 18			

La concentration de la solution de cholate de sodium que nous avons choisie pour cette étude est de 1/4.000, le temps de survie moyen pour des amibes plongées dans une telle solution étant de 113 minutes environ.

Soumises à l'action de fortes concentrations de quinine, les amibes en présence du sel biliaire, sont tuées rapidement après avoir subi le plus souvent une contraction intense. La lyse du protoplasme amibien se fait aussi très vite, l'amibe devient finalement sphérique ; les amibes, non seulement ne diminuent pas de volume mais s'enflent avant la mort en gardant une forme sphérique : l'endoplasme rétracté dans la plupart des cas reste suspendu au centre de la sphère ou accolé contre sa paroi interne.

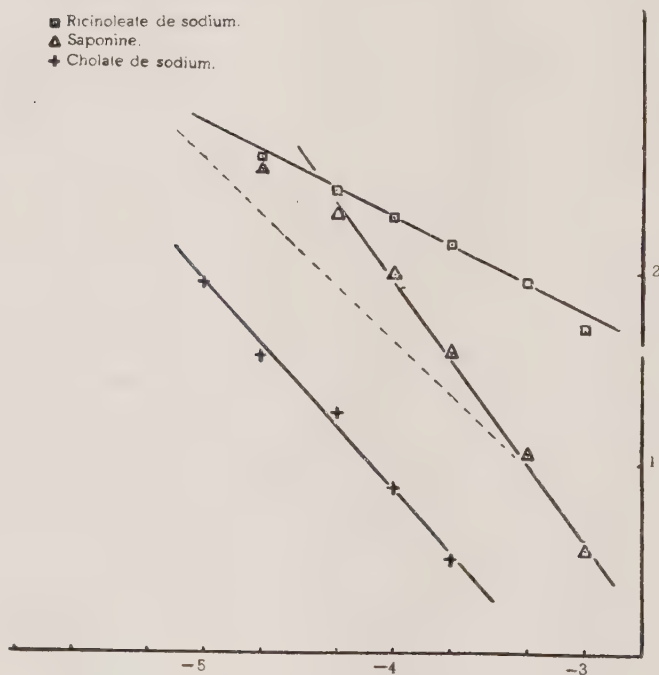


Fig. 5. — Influence des substances cytolytiques sur la toxicité du sulfate de quinine pour *A. dubia*.

En abscisses : Logarithmes des concentrations des solutions de sulfate de quinine,

En ordonnées : Logarithmes des temps d'intoxication.

La courbe en pointillé correspond à la toxicité du sulfate de quinine seul. Les autres courbes correspondent à la toxicité de cet alcaloïde en présence des différentes substances envisagées : ricinoléate de sodium, au 1/20.000 - saponine au 1/400 - cholate de sodium au 1/4.000.

Quelquefois encore, mais plus rarement, la cellule gonflée, présente un contenu homogène. Pour ces mêmes dilutions de quinine, les mouvements intraprotoplasmiques ou trabéculaires, à la période d'agonie, sont extrêmement ralentis, et il faut une observation minutieuse pour les déceler, et saisir le moment où la

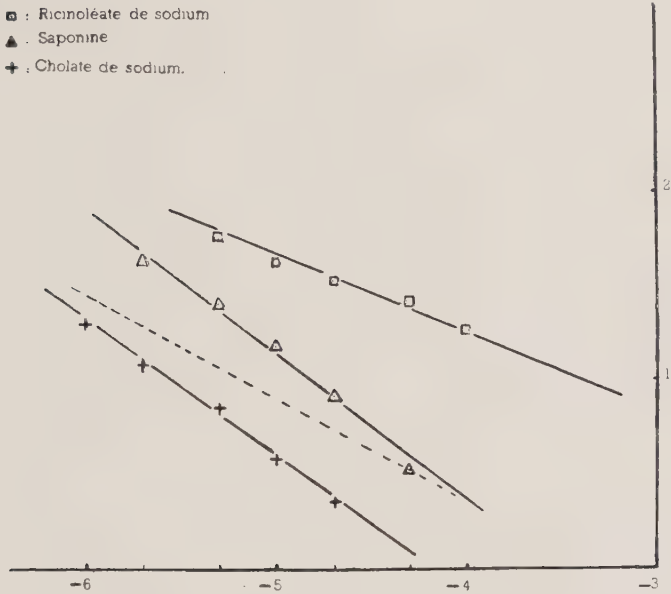


Fig. 6. — Influence des substances cytolitiques sur la pénétration du sulfate de quinine chez *A. dubia*.

En abscisses : Logarithmes des concentrations des solutions de sulfate de quinine,

En ordonnées : Logarithmes des temps d'apparition de la fluorescence.

La courbe en pointillé correspond à la pénétration du sulfate de quinine seul. Les autres courbes correspondent à la pénétration de cet alcaloïde en présence des différentes substances envisagées : ricinoléate de sodium à 1/20.000 - saponine au 1/400 - cholate de sodium au 1/4.000.

cellule meurt, alors qu'aucune modification brusque ne se produit.

Enfin, avec les concentrations relativement faibles de quinine, les amibes, après une période d'immobilité plus ou moins longue, sortent de leur état de repos, et affectent des formes allongées, étirées, semblables à celles que nous avons constatées

dans nos expériences sur la saponine. La mort se traduit toujours cependant par une forme sphérique finale du protozoaire, forme que nous avons décrite précédemment.

INFLUENCES DU CHOLATE DE SODIUM SUR LA PÉNÉTRATION DE LA QUININE :

Là encore, nous avons opéré dans les mêmes conditions qu'avec la Saponine et le Ricinoléate de sodium, en déterminant le temps au bout duquel apparaît dans le protoplasme de l'amibe la fluorescence bleue du sel de quinine. Dans ces conditions, nous avons observé qu'en présence du sel biliaire, la pénétration du sel d'alcaloïde dans la cellule est plus rapide, ce qui vient à l'opposé de ce que nous avons constaté dans le cas des deux premières substances lytiques. De plus, l'intensité de la fluorescence des vacuoles augmente bien plus vite qu'en présence de quinine seule ; la luminosité de celles-ci augmente d'une façon plus rapide et les contours de l'amibe deviennent nettement visibles quelques instants après, ce même phénomène étant relativement lent en l'absence de Cholate de sodium aux mêmes concentrations ($M/10^5$ et $M/5 \times 10^5$).

Nous avons résumé dans le tableau XV et la courbe de la fig. 6, les résultats de nos expériences à ce sujet.

COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS :

1° Observations microscopiques en lumière normale :

a) La Saponine et le Ricinoléate de sodium diminuent la tension superficielle de l'amibe, et la protègent contre l'action toxique de la quinine.

b) Les sels biliaires n'agissent pas beaucoup sur la tension superficielle de la cellule, mais augmentent la toxicité de la Quinine vis-à-vis de celle-ci.

2° Observations microscopiques en lumière Ultra-violette :

a) La Saponine et le Ricinoléate de sodium retardent l'apparition de la fluorescence et par conséquent retardent la pénétration de l'alcaloïde.

b) Les sels biliaires font apparaître plus rapidement la fluorescence et par conséquent, augmentent la perméabilité de la couche externe cellulaire pour la quinine.

Nous arrivons donc à cette conclusion, qu'il était d'ailleurs

logique de prévoir : à une diminution de toxicité de l'alkaloïde correspond une diminution de la pénétration de ce corps dans la cellule, et, au contraire, à une augmentation de toxicité correspond une augmentation de la pénétration.

Ces différentes actions entre la Saponine et le Ricinoléate de sodium d'une part, et le Cholate de sodium d'autre part, semblent donc pouvoir s'expliquer par une action réelle des trois substances sur la surface cellulaire, actions contraires dans les deux cas, pouvant même produire des changements profonds dans la constitution de cette surface limitante.

L'action de la Saponine sur les cellules et les liquides organiques se manifeste comme on le sait par la précipitation du Cholestérol. On sait d'ailleurs, d'après les recherches récentes de G. Valette et R. Cavier (96), que la Lécithine peut être également entraînée dans le complexe insoluble, et l'on sait depuis Meyer et Overton quelle importance prennent ces constituants lipoidiques dans la constitution de la couche externe cellulaire (plasmahaut).

Tout dernièrement, Charonnat, puis Machebœuf et Tayeau ont montré que les savons alcalins exerçaient cette même action précipitante vis-à-vis des lipides du sérum ; d'après Machebœuf, les lipides associés aux globulines seraient seuls libérés dans ces conditions.

Enfin, il ne semble pas, au moins dans le cas du sérum sanguin, que les sels biliaires exercent cette action précipitante sur les constituants lipidiques des liquides organiques. A la faveur de ces travaux, nous pouvons donc émettre l'explication suivante :

1° Le Ricinoléate de sodium et la Saponine provoquant une précipitation du Cholestérol et de la Lécithine à la surface de la cellule entravent la pénétration de la quinine, comme on a pu le mettre en évidence par le retard dans l'apparition de la fluorescence et la très lente augmentation de l'intensité de celle-ci.

2° Le Cholate de sodium abaissant la tension superficielle des solutions employées sans provoquer la précipitation de certains constituants de la surface cellulaire favoriserait la pénétration de l'alkaloïde et par là, augmenterait son action toxique sur la cellule.

§ IV. — ACTION DE LA LECITHINE

Les trois substances que nous avons étudiées (Ricinoléate de sodium, Saponine et Cholate de sodium) exercent leur action,

semble-t-il, sur les constituants lipidiques de la cellule. Nous nous sommes demandé quel effet pourrait avoir sur l'intoxication par la quinine l'action simultanée d'un lipide comme la Lécithine. Certains auteurs ont attribué à la Lécithine une action cytolytique. Il est toutefois difficile de concilier les résultats donnés sur ce sujet par les différents auteurs, ceci provenant du fait que les Lécithines du commerce, même dite « très pure » sont toujours souillées de différentes impuretés (Cholestérol libre ou estérifié, etc...), et l'on sait d'autre part avec quelle rapidité ces substances s'oxydent au contact de l'air.

Levin (B.S.) (47) dans sa thèse de Doctorat es-Sciences a étudié le pouvoir hémolytique de l'ovolécithine et d'une lécithine végétale et a observé que la première exerce une action deux fois plus intense que la seconde, (1/9.600 au lieu de 1/4.800), mais la lécithine et en particulier, l'ovolécithine a surtout été envisagée au point de vue de l'influence favorisante ou inhibitrice qu'elle exerce sur l'action toxique ou cytolytique de certaines substances (alcaloïdes, saponine). En effet, la lécithine, quoiqu'ayant un pouvoir hémolytique marqué, possède une action antihémolytique vis-à-vis de la saponine.

Un des premiers travaux concernant les propriétés particulières de cette substance, est celui de de Waele; en 1901, cet auteur expérimentant sur le lapin et le cobaye, trouve que de petites doses de lécithine injectées à ces animaux en même temps que la Cocaïne, la Strychnine, l'Abrine, favorisent l'action de ces alcaloïdes, alors qu'inversement les fortes doses l'inhibent.

Ces constatations coïncident avec celles de Koch (W.) (38) qui, injectant de la Strychnine base dans les sacs lymphatiques de la grenouille, constate que l'alcaloïde ne devient vraiment actif que si l'on y ajoute une faible proportion de Lécithine. L'action est inversée avec de fortes doses. Ce fait n'est cependant pas général, puisque certains auteurs affirment, au contraire, que les faibles doses de lécithine diminuent l'action toxique de certains alcaloïdes (ce qui est, comme nous le verrons bientôt, en concordance avec nos résultats), et que les fortes doses l'augmentent.

En 1924, Lawrow (D.N.) (46) a repris la question ; fait intéressant, il trouve également que, pour certains alcaloïdes, comme la Strychnine et le Curare, de faibles doses de Lécithine retardent l'effet toxique, alors que les doses moyennes et élevées favorisent l'intoxication. Il constate aussi que, chez le lapin, la lécithine produit un raccourcissement de la narcose par la morphine. Enfin, il affirme qu'en ce qui concerne la Strychnine, la

Lécithine diminuerait la toxicité, quand on injecte l'alcaloïde par voie veineuse, et, au contraire, l'augmente dans le cas d'injections intrapéritonéales.

Quelques années plus tard, B.S. Levin, que nous venons de citer à propos du pouvoir hémolytique de la lécithine, trouve que cette substance exerce une action désintoxiquante vis-à-vis de la Saponine sur *Paramœcium aurelia*. Il remarqua cependant que cette action pour se manifester, demande que les deux substances demeurent en contact pendant quelques temps. Enfin, cet auteur constate également que la lécithine exerce une action protectrice vis-à-vis de la Digitaline, de l'Abrine et de l'Ephédrine.

D'ailleurs, bien avant Levin, Bernard S. (3) en 1923 avait signalé cette influence protectrice de la Lécithine vis-à-vis de l'action hémolysante de la Saponine sur les hématies humaines.

TOXICITÉ DE LA LÉCITHINE EMPLOYÉE (1) :

Si l'action hémolytique de cette substance a été quelque peu étudiée, il n'existe pas dans la littérature de travaux concernant sa toxicité vis-à-vis des protozoaires. Nous avons donc dû, en vue de rechercher l'influence qu'elle peut exercer sur l'action pharmacologique et la pénétration de la quinine, déterminer, comme pour les autres substances que nous avons déjà étudiées, une concentration peu toxique pour *A. dubia* : nous avons donc employé une suspension aqueuse de cette substance à 1/1.000, concentration qui tue les amibes au bout d'un temps moyen de 170 minutes environ, comme le montre le tableau XVI.

L'action toxique de la lécithine sur *A. dubia* ne donne pas lieu à des changements morphologiques particuliers. Les fortes concentrations tuent le protozoaire assez rapidement, après contraction légère de la cellule, alors que les faibles concentrations, non toxiques immédiatement, donnent naissance à des formes allongées peu caractéristiques, dont le mode de propagation rappelle la forme *limax* ; on rencontre d'ailleurs assez souvent cette forme chez *A. dubia* quand l'amibe doit augmenter sa résistance vis-à-vis du milieu ambiant.

INFLUENCE DE LA LÉCITHINE SUR LA TOXICITÉ DU SULFATE DE QUININE :

Nous allons maintenant, parallèlement à nos expériences précédentes, voir comment se comporte l'amibe soumise à l'action des différentes solutions de sulfate de quinine étudiées anté-

(1) La Lécithine utilisée dans nos expériences a été obtenue au laboratoire à partir du jaune d'œuf, et purifiée à l'état de complexe chloro-cadmique.

TABLEAU XVI
Toxicité de la Lécithine
pour *A. dubia*

CONCEN- TRATIONS des Solutions	Temps d'intoxication en minutes	MOYENNE des expériences
1/10 ²	3	3,25
	4	
	3	
	3	
1/10 ^{2,2}	10	10,25
	9	
	11	
	11	
1/10 ^{2,5}	42	37,50
	38	
	30	
	40	
1/10 ³	80	86,25
	92	
	88	
	85	
1/10 ^{3,2}	165	171,66
	178	
	172	

rieurement, en présence d'une solution de lécithine à 1 pour 1.000. Dans de telles conditions, nous avons observé que les amibes en expérience, présentent comme pendant la première partie de l'action de l'alcaloïde, une narcose complète, pour des concentrations moyennes de quinine, l'amibe dont la forme s'est peu modifiée est d'une immobilité complète : la vacuole contractile cesse de fonctionner et s'arrête souvent en systole; les mouvements « trabéculaires » protoplasmiques n'existent presque pas, et il faut une observation minutieuse pour constater que cette immobilité n'est pas absolue et déceler de très légers mouvements du protoplasme, ralentis, de peu d'amplitude et espacés. Malgré cette anesthésie, on ne peut cependant pas conclure que l'amibe est tuée, car l'organisation cellulaire et la réfringence n'ont pas changé ; l'amibe conserve toutes les apparences d'une amibe vivante. D'ailleurs, il suffit de continuer l'observation pour voir le protozoaire sortir peu à peu de son engourdissement ; l'amplitude et l'intensité des mouvements protoplasmiques aug-

TABLEAU XVII

Toxicité et pénétration du Sulfate de Quinine chez *A. dubia*
en présence de Lécithine au 1/1.000

Concentration des solutions C	log. C	Temps d'apparition de la fluorescence en minutes	Moyennes des expériences t_1	log. t_1	C.0,48 t_1	Temps d'intoxication en minutes	Moyennes des expériences t_2	log. t_2	C.1,08 t_2
M.10-4.5	—3,301					6	8,83	0,94	0,0024
						9			
						7			
						10			
						11			
M.10-4.2	—3,70					10	28,50	1,45	0,0028
						30			
						32			
						28			
						23			
M.10-4	—4					30	57	1,75	0,0027
						28			
						65			
						48			
						62			
M.10-5.5	—4,301	6 7 5 6 5	5,8	0,76	0,050	55	133,33	2,12	0,0030
						52			
						60			
						150			
						130			
M.10-5.2	—4,70	9 11 10 8 10	9,6	0,98	0,053	115	278,75	2,44	0,0023
						140			
						120			
						290			
						265			
M.10-5	—5	15 16 13 14 13	14,20	1,15	0,056	310			
						250			
M.10-6.5	—5,301	18 20 21 17 18	18,80	1,27	0,053				
M.10-6.2	—5,70	22 28 26 23 25	24,80	1,40	0,045				

mentent, la vacuole contractile se remet à pulser lentement, des pseudopodes commencent à se former et, enfin, au bout de quelques instants, l'amibe progresse sur son support.

A la mort, les granulations du protoplasme sont animées d'un mouvement de trépidation peu intense.

Les résultats obtenus en fonction de la concentration sont consignés dans le tableau XVII et de la courbe de la fig. 7.

Nous pouvons donc conclure de ces chiffres que la Lécithine exerce une action antitoxique vis-à-vis du sulfate basique de quinine.

INFLUENCE SUR LA PÉNÉTRATION DE LA QUININE :

Jusqu'à présent, nos expériences nous ont toujours confirmé que, chaque fois qu'il y avait diminution de toxicité, il y avait également retard dans la pénétration de l'alcaloïde dans la cellule animale et qu'au contraire, quand la toxicité était augmentée, il y avait accélération de cette pénétration. Les recherches que nous avons effectuées concernant l'influence de la Lécithine sur le même phénomène, ont, quoi qu'à un degré moindre, confirmé nos précédents résultats ; là encore, la diminution de toxicité constatée, coïncide avec une action frénatrice de la Lécithine sur la pénétration de la quinine, comme le prouvent le tableau XVII et la courbe de la fig. 8, où sont résumées nos expériences.

§ V. — SERUM SANGUIN

En dernier lieu, nous avons étudié l'influence qu'exerce le sérum sanguin sur les deux phénomènes considérés jusqu'à présent : toxicité et pénétration de la quinine chez *A. dubia*.

L'action qu'exerce le sérum sanguin sur la toxicité de différentes substances a été envisagée par d'assez nombreux auteurs.

En 1919, Storm van Leeuwen et Eerland ont constaté que l'action de la cocaïne sur l'excitabilité du nerf sciatique de grenouille est diminuée par addition de sérum sanguin de différents animaux.

Un peu plus tard, vers 1922, Storm van Leeuwen et Von Szent Gyorgi ont observé que les colloïdes du sérum entravent l'action de l'Atropine et de la Pilocarpine sur l'intestin isolé.

En 1929, Beutner et Hyden ont constaté que la toxicité de la Pilocarpine est diminuée en présence du sérum de chat ;

La même année, Pagniez a montré que la Picrotoxine peut être neutralisée *in vitro* par le sérum de différents animaux.

Par contre, l'effet qu'exerce le sérum sanguin sur les cellules et les Protozoaires, en particulier, ne semble avoir donné lieu qu'à un seul travail : c'est celui de Milkovitch (G.) (59) qui, en 1931, constate que le sérum humain non seulement ne tue pas le *Glaucoma piriformis* mais au contraire, représente pour cet infusoire un facteur stimulant de vitalité ne provoquant, dans certaines conditions, que des changements morphologiques dans la structure de ce cilié.

Nous avons observé, contrairement à ce que cet auteur a trouvé pour le *Glaucoma piriformis*, que le sérum humain frais est toxique pour *A. dubia*.

Il nous était ainsi indispensable pour étudier son influence sur l'action toxique et la pénétration de la quinine, de déterminer au préalable cette toxicité, afin d'utiliser ultérieurement une solution n'entraînant pas la mort de l'amibe dans les conditions de nos expériences ; une dilution de sérum au 1/10 donne, pour *A. dubia*, un temps de survie moyen de 230 à 250 minutes.

Avec les fortes concentrations de sérum sanguin (sérum pur ou au 1/3) la cellule comme dans la plupart des cas d'intoxication rapide, réagit en contractant ses pseudopodes ; le protoplasme subit une contraction dont l'importance dépend de la concentration employée, mais qui est en général assez faible.

Au moment de la mort, l'amibe qui s'est décontractée, conserve un aspect irrégulièrement lobé. Il est surtout curieux de constater les changements morphologiques qui surviennent chez l'amibe soumise à l'action d'une dilution de sérum sanguin au 1/4 ou au 1/5. Après quelques instants de contact, le protoplasme prend un aspect particulier, qui rappelle assez bien ceux qu'ont décrit Mast et Doyle pour *A. proteus*, soumise à l'action d'une solution d'albumine à 3 %. La cellule est creusée de profondes échancrures qui pénètrent assez loin dans le protoplasme, divisant la cellule en nombreux lobes élargis à la base, et s'amincissant vers le sommet avec des extrémités obtues (voir fig. 5, planche II).

Ces protubérances s'éloignent peu à peu les unes des autres et l'amibe prend bientôt un aspect étoilé caractéristique, avec des expansions digitées, sortes de pseudopodes épais cylindriques, très longs et arrondis au sommet.

Cet aspect de l'amibe rappelle un peu les formes étirées allongées, rencontrées quelquefois chez les amibes soumises à l'action de concentrations de Saponine peu toxiques, et aussi

TABLEAU XVIII

Toxicité et pénétration du Sulfate de Quinine chez *A. dubia*
en présence de Sérum sanguin au 1/10

Concentration des solutions C	log. C	Temps d'apparition de la fluorescence en minutes	Moyennes des expériences t_1	log. t_1	C. 0,46 t_1	Temps d'intoxication en minutes	Moyennes des expériences t_2	log. t_2	C. 0,93 t_2
M.10-3	—3	}				26 18 20 22 24	22	1,34	0,0356
M.10-4,5	—3,301	}				36 40 44 38 41	39,80	1,60	0,033
M.10-4,2	—3,70	}				72 85 78 88 95	83,60	1,92	0,030
M.10-4	—4	}				175 190 195 180 205	188	2,27	0,035
M.10-5,5	—4,301	5 4 6 4 5	4,8	0,68	0,0504	375 335 350 380 340	356	2,55	0,035
M.10-5,2	—4,70	11 9 10 9 10	9,8	1	0,067	18 à 24 h. et +			
M.10-5	—5	14 16 15 12	14,25	1,15	0,071				
M.10-6,5	—5,301	22 19 17 21	19,75	1,29	0,071				
M.15-6,2	—5,70	27 30 29 28	28,50	1,45	0,068				

de Lécithine. La figure 6, Planche II, reproduit l'aspect caractéristique de l'amibe à ce stade.

INFLUENCE SUR LA TOXICITÉ ET LA PÉNÉTRATION DE LA QUININE :

Effectuées dans les mêmes conditions et par la même méthode que précédemment, nos expériences concernant l'action exercée par le sérum sanguin sur la toxicité du Sulfate de quinine, nous ont permis de constater une action antitoxique vis-à-vis de cet alcaloïde. Les faits observés se rapprochent de ceux que nous avons constatés dans l'action de la Lécithine.

Les résultats des expériences sont résumés dans le tableau XVIII et la courbe de la fig. 7.

Si nous comparons ces résultats avec ceux qui se rapportent à la Lécithine, nous constatons que le pouvoir antitoxique du sérum est beaucoup plus fort que celui de la Lécithine.

Soumises à l'action toxique de la quinine en présence de sérum sanguin, les amibes ne présentent pas de changements morphologiques très particuliers. Même en présence des fortes concentrations de Sulfate de quinine, elles ne subissent pas de diminution de volume sensible ; au contraire, on observe quelquefois, une légère augmentation de la surface cellulaire. De plus, elles conservent longtemps leur aspect normal et ne deviennent sphériques que très peu de temps avant leur mort. A cette période, comme nous l'avons vu dans le cas de la Lécithine, les mouvements protoplasmiques sont extrêmement lents, et il faut une observation minutieuse pour les déceler.

A la mort, le protoplasme est fluidifié ; les granulations qui y sont contenues, sont en effet, dans la plupart des cas, animées d'un mouvement de trépidation caractéristique.

Devant cette inhibition de l'action toxique de la quinine, produite par le sérum, nous nous sommes demandé si cette influence protectrice avait pour cause une pénétration retardée de l'alcaloïde à l'intérieur de la cellule.

Les expériences que nous avons effectuées dans ce sens nous ont confirmé que, comme dans le cas de la Lécithine, la substance toxique pénétrait moins vite à travers la couche limitante cellulaire ; l'apparition de la fluorescence des vacuoles étant retardée comme le montrent les chiffres expérimentaux du tableau XVIII et la courbe correspondante de la fig. 8. De plus, le pouvoir de condensation des vacuoles vis-à-vis de l'alcaloïde est également diminué, l'intensité de la fluorescence augmentant très lentement.

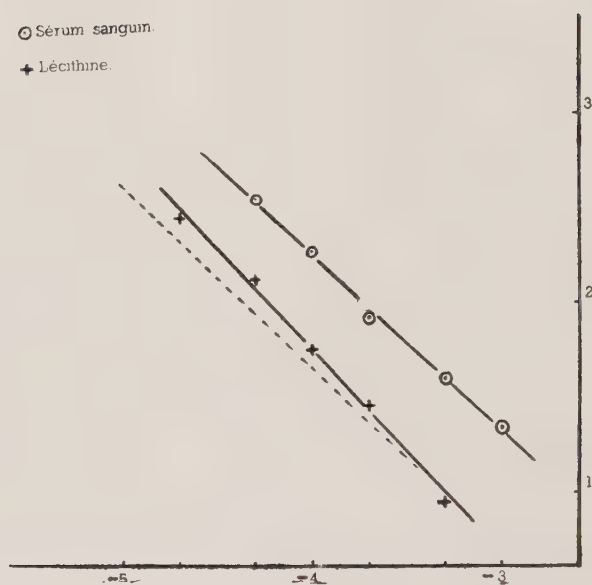


Fig. 7. — Influence de la lécithine et du sérum sanguin sur la toxicité du sulfate de quinine pour *A. dubia*.

En abscisses : Logarithmes des concentrations des solutions de sulfate de quinine,

En ordonnées : Logarithmes des temps d'intoxication.

La courbe en pointillé correspond à la toxicité du sulfate de quinine seul. Les autres courbes correspondent à la toxicité de cet alcaloïde en présence des deux substances envisagées : lécithine au 1/1.000 - sérum sanguin au 1/10.

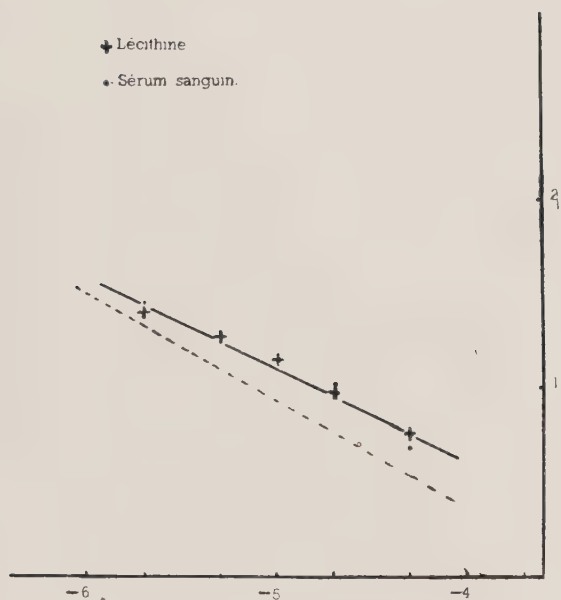


Fig. 8. — Influence de la lécithine et du sérum sanguin sur la pénétration du sulfate de quinine chez *A. dubia*.

En abscisses: Logarithmes des concentrations des solutions de Sulfate de quinine,

En ordonnées : Logarithmes des temps d'apparition de la fluorescence.

La courbe en pointillé correspond à la pénétration du sulfate de quinine seul. Les autres courbes correspondent à la pénétration de cet alcaloïde en présence des deux substances envisagées : lécithine au 1/1.000 - sérum sanguin au 1/10.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

1° L'observation au microscope à fluorescence d'amibes placées dans une solution de sulfate de quinine a permis de mettre en évidence une fixation de l'alcaloïde au niveau du vacuome, en accord avec ce que G. Valette avait observé sur les paramécies.

Cette fixation a lieu également au niveau de certaines inclusions protoplasmiques autres que les vacuoles.

La concentration de la quinine en tous ces points, est telle que la fluorescence qu'ils présentent est notablement plus intense que celle que produirait une solution saturée de Sulfate de quinine examinée dans les mêmes conditions.

On en vient donc à penser que la quinine se condense fortement sur certains constituants cellulaires, vraisemblablement par un processus d'adsorption.

2° L'action toxique de l'alcaloïde est liée à la concentration des solutions par la loi :

$$Ct_1 = K$$

C, étant la concentration de la solution utilisée.

t_1 étant le temps au bout duquel on observe la mort de 80 à 90 % des amibes en expérience.

3° La vitesse de pénétration du toxique à l'intérieur de la cellule, est également fonction de la concentration des solutions alcaloïdiques ; la relation étant de la forme :

$$C^{0,56}t_2 = K'$$

t_2 étant le temps au bout duquel la fluorescence apparaît chez les amibes.

4° L'action toxique de la quinine dépend du pH des solutions ; elle diminue de pH : 3,2 à pH : 4, puis à partir de là, varie dans le même sens que le pH, conformément à ce qu'on trouvé la plupart des auteurs.

5° Un colorant vital tel que le Rouge neutre, une fois fixé sur le vacuome de l'amibe peut être déplacé par la quinine, et

l'action toxique des deux substances agissant simultanément, est supérieure à celle de la quinine seule.

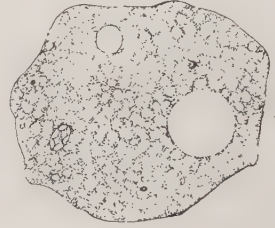
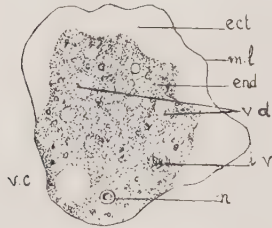
6° Nous avons observé que des amibes chargées de quinine et soumises à une immersion prolongée dans l'eau distillée, cèdent peu à peu le toxique au milieu ambiant, la fluorescence du début disparaissant peu à peu.

7° La pénétration de la quinine dans le protoplasme de l'amibe, et l'action toxique de cet alcaloïde sont influencés de manières diverses par les substances douées d'une action cytolytique. Tandis que la Saponine et le Ricinoléate de sodium retardent la pénétration de l'alcaloïde et par suite, l'intoxication des amibes, le Cholate de sodium accélère cette pénétration au sein du protozoaire et augmente l'action toxique.

8° La Lécithine et le Sérum sanguin exercent également une action antitoxique vis-à-vis de la quinine par suite du retard qu'ils apportent à la pénétration de l'alcaloïde à l'intérieur de l'amibe.

PLANCHE I

A. dubia. — Aspect normal et après action des rayons U.V.



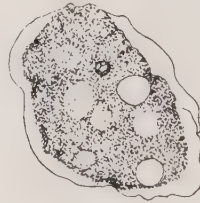
A. dubia — Grandeur naturelle à l'objectif 6
 ect. : ectoplasme, end. : endoplasme
 n. : noyau, v. c. : vacuole contractile
 v. d. : vacuoles digestives
 i. v. : inclusion vacuolaire
 m. l. : membrane limitante.*

Action de la lumière U. V.

A. dubia. — Intoxication par des solutions de quinine à différents pH :
 Aspect au moment de la mort.



pH 3.2



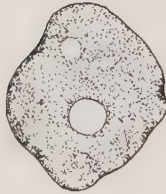
pH 4



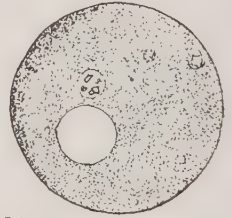
pH 5.2



pH 6.0



pH 7.0



pH 8.0

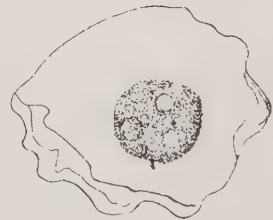
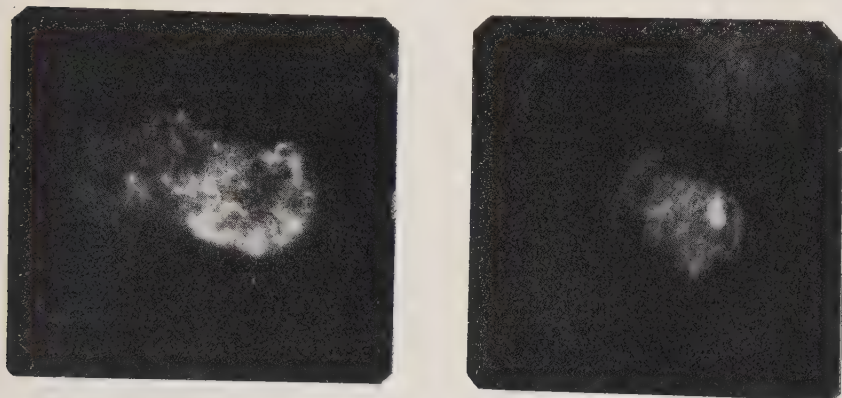


PLANCHE II

A. dubia. — Fluorescence obtenue après action d'une solution de sulfate de quinine.



Action de différentes substances sur *A. dubia*.



Fig 2, Saponine.



Fig 3

Ricinoléate de sodium

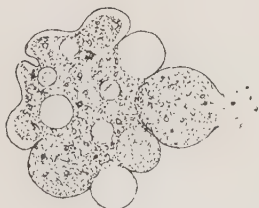


Fig 4. — Intoxication par la quinine en présence de ricinoléate de sodium

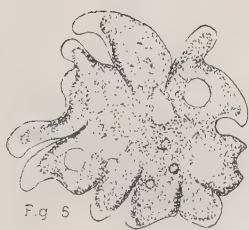


Fig 5

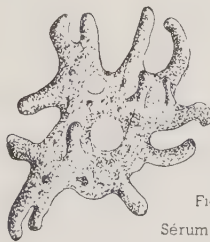


Fig 6

Sérum sanguin



BIBLIOGRAPHIE

- (1) ANNAU (E.) et HERGLOZ (I.). — Uber Resorptions-forderung und Potenzierung der Alkaloide und Salze durch Saponine. *Arch. f. exp. Path. und Pharmakol.* **27**, 93 bis - 100. (1927).
- (2) BELFANTI (S.). — Les lipoides dans l'hémolyse. Rapport au premier Congrès de Microbiologie, Paris 1930.
- (3) BERNARD (S.). — Influence de la lécithine sur l'action hémolytante de la saponine. *C.R. Soc. Biol.* **89**, 225 (1923).
- (4) BIANCANI (E. et H.). — Action de quelques agents physiques et chimiques sur la mobilité de l'infusoire cilié. *C.R. Ac. Sci.* **178**, 800 et 924 (1924).
- (5) BINET (L.) et FABRE (R.). — Répartition de la Quinine entre les globules rouges et le plasma sanguin. *J.P.C.* **11**, 55 (1930). *C.R. Soc. Biol.* **101**, 1068 (1929).
- (6) BLACK. — Some observations on ultra violet irradiated amoebas. *Science.* **82**, 495 (1935).
- (7) BRINLEY (J.). — Effect of chemical on viscosity of protoplasm as indicated by brownian movement. *Protoplasma* **4**, 177 (1928).
- (8) BRINLEY (F.-J.). — The effect of ammonium salts on protoplasma of ameba. *Biological Bull.* **56**, 371 (1929).
- (9) CANALS (E.), PERROTET (S.) et PEYROT (P.). — Fluorescence of quinine salts. *Bull. Soc. Chim.* **2**, 21 à 26 (1935).
- (10) CANTACUZENE (A. et A.). — Sensibilité des infusoires vis-à-vis de la quinine. *C.R. Soc. Biol.* **93**, 600 (1925).
- (11) CAVIER (R.). — Le pouvoir hémolytique des savons alcalins : Influence de la nature de l'acide gras. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **18**, 1663 (1937).
- (12) CHARONNAT (R.). — Influence de divers sels sur la libération du cholestérol sanguin. Communication à la Soc. Pharm. du 8 Janvier 1936.
- (13) CLARK. — General Pharmacology, in Handbuch der exp. Pharmakol. (Heffter). J. Springer 1937 (Berlin).

- (14) COLOMBIER (L.). — Fluorescence de la quinine en lumière ultra-violette. *An. fals.* **24**, 89 à 96 (1931).
- (15) CORRAN, WILLIAM (J.) et Mc GULLAGH W. CUDMORE. — Lecithin and cholesterol in relation to the physical nature of cell membranes. *Bioch. J.* **18**, 1364 (1924).
- (16) CRANE MARIAN (M.). — The effect of hydrogen ion concentration on the toxicity of alkaloids for paramœcium. *Journ. of Pharmacol. a exp. Therapeut.* **18**, 319-339 (1921).
- (17) DHERE (Ch.). — La fluorescence enbiochimie. *P. Univers.* 1937.
- (18) DOPTER (Ch.) et DESCHIENS (R.). — Action des sels biliaries et du cholestérol sur les amibes dysentériques. *Séance Soc. Biol.* du 10/12/1938.
- (19) FABRE (R.). — Répartition entre les globules rouges et plasma sanguin de quelques substances chimiques employées en thérapeutique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **12**, 954 (1930).
- (20) FABRE (R.) et BINET (L.). — Répartition de la quinine entre les globules rouges et le plasma sanguin. *J.P.C.*, **11**, 55 (1930).
- (21). FABRE (R.) et SIMONNET (H.). — Contribution à l'étude de l'hémolyse. *Ann. Physiol. et de Physico-Chim. Biol.*, **4**, 531 (1928).
- (22) FEILER (M.). — Uber die Chininwirkung auf die Tierzelle (1). *Arch. fur. Protistenk*, **59**, 562 (1927);
 — Uber die Chininwirkung auf die Tierzelle (2). *Arch. fur. Protistenk*, **61**, 119 (1928).
 — Weitere Untersuchungen uber die oligodynamen Wirkungen der Alkaloide auf Paramecium Caudatum (3). *Arch. fur. Protistenk*, **67**, 157 (1929).
- (23) FORTI (C.). — The stimulating action of alcohols and alcaloids on ameboid movement. *Boll. soc. Ital. Biol. Sper.* **2**, 185-187 (1927).
- (24) FOURMENT (P.) et HERMANN (H.). — Sur la pénétration de la quinine dans les globules rouges. *B.S.P.*, **37**, 348 (1930).
- (25) GAUSE (G.F.). — Certain properties of curves of toxicity. *Protoplasma*, **17**, 548 à 553 (1933).
- (26) GELLHORN (E.) et RÉGNIER (J.). — La perméabilité en physiologie et en pathologie générale. *Paris, Masson* 1936.
- (27) GOLJACHOWSKI (N.W.). — Uber die Bedeutung der aktuellen Reaktion des Milieus für die Wirkung der Gifte. *Arch. Intern. Pharmacodynamie*, **48**, 271/281 (1934).
- (28) HEILBRUN (L.V.) et DAUGHERTY (K.). — The action of ultra-violet rayon on Amoeba protoplasm. *Protoplasma*, **18**, 596 (1933).

- (29) HENRY (T.A.) et BROWN (H.C.). — The influence of the medium on the toxicity of certain alkaloids towards protozoa. *Trans. Roy. Soc. Tropical Med. Hyg.* **17**, 61 à 71 (1923).
- (30) HILLER (S.). — Action of Narcotics on the Ameba by means of Micro-injection and Immersion. *Proc. Soc. exp. Med. Biol. Med.* **24**, 427 (1926).
- (31) HIRAMATSU (J.). — Über den Einfluss des Chinins auf den Stoffwechsel. *Jap. J. Med. Sci. Trans. IV Pharmacol.* **5**, 61 (1931).
- (32) HOLSTE (A.). — Die pharmakologische und klinische Bedeutung der Gallensäure. *Sapiski Arch. Lekarst.* **38**, 69 (1936). *B. f.d.g. Ph.* **94**, 18 (1936).
- (33) HOPKINS (D.L.) et JOHNSON (P.L.). — Amoeba proteus. Culture in known salt solutions. *Biol. Bull. Marine*, **56**, 68 (1929).
- (34) HOWLAND (R.B.) et POLLACK (H.). — The significance of gelation in the systole of the contractile vacuole, of A. dubia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **24**, 377 (1926-27).
- (35) IRWIN (M.). — On the accumulation of dye in Nitella. *J. of Gen. Physiol.* **8**, 147 (1928).
- (36) JOACHIMOGLU (G.). — Über die Wirkung von Sublimat, Phenol und Chinin auf Hefe. *Biochem. Zeits.* **130**, 239 (1922).
- (37) JOHNSON (P.). — Reproduction in Amoeba proteus. *Arch. f. Protistenk.* **71**, 462-498 (1930).
- (38) KOCH (W.). — Die Bedeutung der Phosphatide (Lecithane) für die lebende Zelle I - *Z. physiol. Chem.* **37**, 181 (1903).
— Die Bedeutung der Phosphatide (Lecithane) für die lebende Zelle II. - *Ebenda*, **63**, 432 (1908).
- (39) KOFLER (L.). — Chemische, physikalische und biologische eigenschaften der Saponine. *Protopl.* **7**, 106 (1929).
- (40) KOPACZEWSKI (W.). — Phylaxie et antagonismes physico-chimiques. *J. Physiol. et Path. gén.* **33**, 7 (1935).
- (41) LABES (R.) et SCHLENKERT (Th.). — Über das Verhalten von desoxycholsäuren Natrium und Saponine gegenüber Membranen und Gewebsbestandteilen. *Arch. f. exp. Path.* **166**, 186-204 (1932).
- (42) LANGERON (M.). — Précis de microscopie. 5^e éd. Paris, Masson (1934).
- (43) LARSON (W.P.), EVANS (R.D.) et NELSON (E.). — The effect of sodium ricinoleate upon bacterial toxins, and the value of soap-toxin mixtures as antigens. *Proc. of Soc. for exp. Biol. and Med.* **22**, 194 (1924-25).
- (44) LARSON (W.P.) et NELSON (E.). — The antigenic properties of pneumococcus treated with sodium ricinoleate. *Proc. of Soc. for exp. Biol. and Med.*, **22**, 357 (1924-25).

- (45) LAUER (A.). — Über den Einfluss der Alkaloide auf die vitale Färbung mit basischen Farbstoffen. *Pflug. Arch.*, **224**, 462-470 (1930).
- (46) LAWROW (D.M.). — Zur Frage nach der Beeinflussung der Wirkung von Medicamenten durch Lecithin V. *Biochem. Zeits.* **150**, 177 (1924).
- (47) LEVIN (B.S.). — Action des lipoïdes sur les phénomènes de lyse. *Thèse de Doctorat Univers. (Sciences)* (1933).
- (48) LUCE (R.H.) et POHL (A.W.). — Nature of crystals found in Amoeba. *Science*. **82**, 595 (1935).
- (49) MACHEBŒUF (M.) et TAYAU (F.). — Nouvelles recherches sur la nature et la stabilité des liaisons unissant les lipides aux protéïdes dans le sérum sanguin. Libération des lipides de certaines cénapses lipidoprotéïdiques par divers savons. *Soc. Chimie Biol.* Séance 6/12/38.
- (50) MACHT (D.I.) et TEAGRADEN (E.J.). (Cité par ZUNZ). *Journ. of Pharmacol.* **22**, 2134 (1923).
- (51) MAST (S.O.) et DOYLE (W.L.). — Ingestion of fluid by Ameba. *Protoplasma*, **20**, 555 à 560 (1934).
- (52) MAST (S.O.) et DOYLE (W.L.). — Structure, origin and function of cytoplasmic constituents in A. proteus. *Arch. f. Protistenk*, **86**, 155-180 (1935).
- (53) MAST (S.O.) et DOYLE (W.L.). — Effect of centrifuging on A. proteus. *Arch. f. Protistenk*, **86**, 278 (1935-36).
- (54) MAYEDA (S.). — Beitrage sur Erforschung des Wirkungs - mechanismus der China - alkaloide bei freilebenden Organismen. *Beitz. z. Arch. f. Schiffs - u - Tropen - Hyg.* **32**, 129 (1928).
- (55) MEDVECZKY (A.) et VOTIN (L.). — Die Seifenhämolyse als Fettsäuren-hämolyse. *Bioch. Ztschr*, **284**, 244 (1936).
- (56) MEIER (R.). — Über « Reizwirkung » an Einzelzellen. *Arch. f. exp. Path.* **122**, 129 (1927).
- (57) MEYER (E.) et REINHOLD (A.). — Tissue respiration on living subjects. *Klin. Woch.* **5**, 1692-96 (1926).
- (58) MILANESI (E.). — Intensita di azione der sali di chinina in rapporto alla loro fluorescenza. *Boll. Soc. Ital. Biol. Sper.* **3**, 1185 bis, 1187 (1928).
- (59) MILKOVITCH (G.). — Action du sérum sanguin humain sur un infusoire (Glaucoma piriformis). *Bull. Biol. France et Belg.* **65**, 103 (1931).
- (60) MIZUTANI (K.). — Über den Einfluss des Chinins auf die Gewebssatmung und die Beziehung zwischen Chinin und Verschiedenen Hormonen bei derselben. *Fol. Endocrin. Jap.* **8**, 97-98 (1933).

- (61) MOUTON (H.). — Recherches sur la digestion chez les amibes et sur leur diastase intra-cellulaire. *Ann. Inst. Pasteur*, **16**, 468 (1902).
- (62) NEUSCHLOSZ (S.). *Pflug. Arch.*, **176**, 123 (1919).
- (63) NITZESCU (I.I.) et COSMA (I.). — Action de quelques antipyrétiques sur la respiration des tissus. *C.R. Soc. Biol.* **89**, 1406-7 (1923).
- (64) OSTERHOUT. — The effect anesthetics upon permeability *Science* **37**, 111 (1913).
- The decrease of permeability produced by anesthetics. *Botan. Gaz.* **61**, 148 (1916).
- A comparative study of permeability in plants. *Jour. of. gen. Physio.* **1**, 299 (1919).
- (65) OVERTON (E.). — Studien über die Narkose. *Iena* 1901.
- (66) PACE (D.M.). — The relation of inorganic salts to growth and reproduction in *A. proteus*. *Arch. f. Protistenk.* **79**, 133 (1933).
- (67) PAGE (H.), SHONLE (H.A.), CLOWES (G.H.A.). — The relation of interfacial tension to cytolysis of sea-urchins eggs by soaps. *Protoplasma*, **19**, 213 (1933).
- (68) PANTIN (C.F.A.). — On the physiology of ameboid movement. *Proc. Roy. Soc.* **105** (B), 538-579 (1930).
- (69) PARTACHNIKOFF (M.). — Croissance et métabolisme des tissus « in vitro » sous l'action de la quinine. *C.R. Soc. Biol.* **104**, 1.163 (1930).
- (70) PASCUCCI (O.). — Die Zusammensetzung des Blutscheibenstromas und die « Hämolyse : I ». Die Zusammensetzung des Stromas **6**, 543 (1905). *Hofmeisters Beitr.*
- (71) PENARD (E.). — Nouvelles recherches sur les amibes du groupe *terricola*. *Arch. f. Protistenk.* **28**, 78 (1912-13).
- (72) PICON (M.). — Solution injectable isotonique de savon. *Journ. Pharm. et de Chimie*, **11**, 481-484 (1930).
- (73) PONDER (E.). — The hemolytic action of the soaps. *Bioch. Journ.* **43**, 845 (1936).
- (74) PROWAZEK. — Giftwirkung und Protozoenplasma. *Arch. f. Protistenk.* **18**, 221 (1910).
- (73) PONDER (E.). — The hemolytic action of the soaps. *Bioch. Journ.* trose and ethylene-glycol on *Amoeba proteus*. *Proc. Soc. f. Exp. Biol. and Med.* **24**, 380 (1926).
- (75) REZNIKOFF (P.). — Micrurgical studies of soaps, glycerine, dextrin pharmacologie - 7^e Ed. *Paris, Masson* (1935).
- (77) RONA (P.) et AIRILA (Y.) et LASNITZKI (A.) - (Cité par CLARK). *Biochem. Zeits.* **130**, 582 (1922).

- (78) RONA (P.) et BLOCH (E.). — Beitrage zum Studiender Giftwirkung. Über die Wirkung die Chinins auf Invertase. *Biochem. Zeits.* **118**, 185 (1921).
- (79) RONA (P.) et BLOCH (E.). — Weitere Untersuchungen über die Bindung des Chinins an die roten Blutkörperchen und über die Wirkung des Chinin auf die Zellatmung. *Biochem. Zeits.* **128**, 169 (1922).
- (80) RONA (P.) et GRASSHEIM (K.). — Studien zur Zellatmung.
- I. — Mitt. — Beitrage zur Atmung der Hefezellen. *Biochem. Zeits.* **134**, 146 (1923).
- II. — Mitt. — Die Wirkung von Chinin auf die Atmung lebender Hefezellen. *Biochem. Zeits.* **140**, (1923).
- (81) RONA (P.) et NICOLAI (H.W.). — Untersuchungen über die Giftwirkung der Chininkörper auf das Gärvermögen lebender Hefe. *Biochem. Zeits.* **189**, 331 (1927).
- (82) ROSKIN (Gr.). — The action of chemical on cells. *Z. Immunitats.* **84**, 251 à 267 (1935).
- (83) ROSKIN (Gr.). — Arzneimittel und ultravioletten Strahlen.
- III. — Mitt. — Zur analyse der Kombinierten Wirkung von Chinin und ultravioletten Strahlen auf die Zelle. *Z. Immunitats.* **63**, 452 (1929).
- (84) ROSKIN (Gr.) et DUNE (Ed.). — Zur frage über die Wirkung des Chinins auf die Zelle *Arch. f. Protistenk.* **66**, 346 (1929).
- (85) ROSKIN (Gr.) et ROMANOVA (K.). — The action on paramecia of quinine irradiated with ultra violet light. *Z. Immunitats.* **62**, 147 (1929).
- (86) RUSZNYAK (S.). — Acceleration of the effect of quinine through fluorescent substances *Wien. Klin. Wochschr.* **33**, 6/8 (1920).
- (87) SARASI LAL SARKAR. — The action of quinine on *P. caudatum*. *Arch. f. Protistenk.* **87**, 268 (1936).
- (88) SCHAEFFER (A.A.). — Notes on the specific and others characters of *A. proteus*. *Arch. f. Protistenk.* **37**, 204 (1916-17).
- (89) SHIGEO YAMANCHI. — The narcotic reenforcing action of yohimbine, quinine, cinchonine and ergotamine. *Folia Pharmacol. Japon.* **16**, 309-324 (1933).
- (90) STORM VAN LEEUWEN (W.) et LE HEUX. — Zusammenhang zwischen Konzentration und Wirkung von verschiedenen Arzneimitteln. *Pfl. Arch.* **177**, 250 (1919).
- (91) STRAUB (W.). Die Bedeutung der Zellmembran für die Wirkung chemischer Stoffe auf der Organismus. *Arch. f. exp. Path. u. Pharmacol.* **51**, 383-390 (1904).

- (92) SUYDAM BREHME (K.). — An investigation of the question of cyto-
cence. *C.R. Ac. Sc.*, **201**, 681 (1935).
- (93) VALETTE (G.). — Etude de la fixation de la quinine sur les para-
mécies au moyen de l'examen microscopique de la fluores-
cence. *C.R. Ac. Sc.*, **201**, 681
- (94) VALETTE (G.). — L'action hydrotrope des savons et des sels
biliaires pour la lécithine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **19**, 1676
(1937).
- (95) VALETTE (G.). — Action comparée de l'oléate et du ricinoléate
de sodium sur la lécithine. *C.R. Soc. Biol.* **122**, 150 (1936).
- (96) VALETTE (G.) et CAVIER (R.). — L'action de quelques savons
alcalins, des sels biliaires et du digitonoside sur les mélanges
de lécithine et de cholestérol. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **20**, 1256
(1938).
- (97) VON JANCZO (N.). — Beobachtung Chemotherapeutischer Vorg-
änge im fluorescenz Mikroskop. *Klin. Woschen.* **1**, 689 (1932).
- (98) VON TAPPEINER (H.). — (Cité par ZUNZ). *Ergebn. d. Physiol.* **8**,
698-741 (1909).
- (99) VON WASIELEWSKI (Cité par LANGERON). *Abh. d. Heidelberger
Akad. d. Wiss.* **1** (1910).
- (100) WARASI (W.). — Über das Problem der Chinin Wirkung. *Arch.
Schiffs - u. Tropen - Hyg.* **38**, 222 (1934).
- (101) WEST MELLER JETTE. — Fluorescence des différents sels de
quinine. *Biol. Roy. Soc.* **121**, 294 à 313 (1928).
- (102) WOLFF (P.). — Adaptation des amibes aux solutions salines.
C.R. Ac. Sc. **184**, 1093 à 1095 (1927).
- (103) YUN-ICHI MORITA et CHAMBERS (R.). — Permeability differences
between nuclear and cytoplasmic surfaces in *A. dubia*. *Biol.
Bull. Marine Biol. Lab.* **56**, 64-67 (1929).
- (104) ZUNZ (Ed.). — I. — Eléments de pharmacodynamie générale,
Paris, Masson (1930). — II. — Eléments de pharmacodynamie
spéciale, Paris, Masson (1932).

TABLE DES MATIÈRES

PLAN	13
INTRODUCTION	15

CHAPITRE PREMIER

Généralités concernant l'Action de la Quinine sur les Protozoaires

§ I. — Action de la Quinine sur les cellules et les tissus	18
§ II. — Influence de différents facteurs sur l'action physiologique de la Quinine	23
§ III. — Fixation de la Quinine sur les cellules	25

CHAPITRE II

Culture et isolement des Amibes

§ I. — Milieux de culture	29
§ II. — Différentes espèces d'amibes étudiées et caractérisation de <i>Amœbia dubia</i>	34

CHAPITRE III

Fluorescence de la Quinine

§ I. — Etude macroscopique du phénomène	43
1° Généralités	43
2° Influence du pH	45
3° Influence des sulfates alcalins	46
4° Action de l'ion chlore	47
5° Action des hématies	48
6° Action du sérum sanguin	50
§ II. — Microscopie de fluorescence	51

CHAPITRE IV

Résultats Généraux concernant l'action du Sulfate de Quinine sur les Amibes

§ I. — Détermination de la mort d'une amibe. Intoxication	5
§ II. — Etude de la pénétration du Sulfate de Quinine par l'observation en lumière ultra-violette	66
§ III. — Influence du pH sur la toxicité et la pénétration de la Quinine	70
§ IV. — Pénétration du rouge neutre chez les amibes et influence du colorant sur la toxicité et la pénétration du Sulfate de Quinine	73
§ V. — Elimination du Sulfate de Quinine	77

CHAPITRE V

L'action du Sulfate de Quinine sur les Amibes en présence des différentes substances

§ I. — Influence des saponines	81
§ II. — Influence des savons	87
§ III. — Influence des sels biliaires	94
§ IV. — Influence de la lécithine	101
§ V. — Influence du sérum sanguin	106
CONCLUSIONS GÉNÉRALES	113

VU ET ACCEPTÉ :
Le Président de la Thèse,
L. LAUNOY.

VU :
Le Doyen de la Faculté,
A. DAMIENS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :
Le Recteur de l'Académie de Paris,
G. ROUSSY.

